

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Alteraciones asociadas al metabolismo de los aneurismas de
aorta abdominal: estudio proteómico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Manuela María Hernández Mateo

Directores

Francisco Javier Serrano Hernando

Antonio José López Farré

Guillermo Moñux Ducajú

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**ALTERACIONES ASOCIADAS AL METABOLISMO DE
LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL:
ESTUDIO PROTEÓMICO**

TESIS DOCTORAL

MANUELA MARÍA HERNÁNDEZ MATEO

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**ALTERACIONES ASOCIADAS AL METABOLISMO DE
LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL:
ESTUDIO PROTEÓMICO**

TESIS DOCTORAL

MANUELA MARÍA HERNÁNDEZ MATEO

DIRECTORES DE TESIS

FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO

ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ

GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ

MADRID, 2015



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Manuela María Hernández Mateo
Título de la Tesis	Alteraciones asociadas al metabolismo de los aneurismas de aorta abdominal: Estudio proteómico
Facultad o Centro	Medicina

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Francisco Javier Serrano Hernando
Centro al que pertenece y dirección	Hospital Clinico San Carlos. Facultad de Medicina. C/Martin lagos s/n 28040 Madrid
D.N.I./Pasaporte	45700951c
e-mail	fserrano@salud.madrid.org

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	x			
Definición Objetivos	x			
Metodología	x			
Relevancia Resultados	x			
Discusión / Conclusiones	x			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

Se trata de un estudio experimental sobre la etiopatogenia de la enfermedad aneurismática de la aorta . Las alteraciones del metabolismo celular en los aneurismas han sido escasamente estudiadas, por lo que este estudio supone una aportación de gran interés.

Se analiza la alteración en el metabolismo de la glucosa mediante estudio proteómico de las enzimas implicadas en el mismo, comparando una muestra de aorta aneurismática frente a un grupo control de aortas sanas.

En el trabajo se realiza una detallada revisión y puesta al día sobre el metabolismo de la pared aortica, así como de las características epidemiológicas, clínicas y evolutivas de la enfermedad aneurismática.

La metodología es correcta y los resultados están expuestos de forma clara, ajustándose a los objetivos del estudio. En la discusión se evalúan con precisión el valor de los hallazgos y se analizan los puntos débiles del estudio. La bibliografía es correcta y está actualizada.

En resumen, se trata de un estudio experimental original, que aporta hallazgos nuevos en relación al metabolismo anaerobio en la pared de los aneurismas y abre novedosas formas de investigación de esta patología.

Madrid, a 27 de Octubre de 2015

Fdo.: FJ Serrano Hernando



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Manuela M. Hernández Mateo
Título de la Tesis	Alteraciones asociadas al metabolismo de los aneurismas de aorta abdominal: estudio proteómico
Facultad o Centro	Universidad Complutense de Madrid

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Antonio José López Farré
Centro al que pertenece y dirección	Departamento de Medicina, Universidad Complutense de Madrid
D.N.I./Pasaporte	50704818 F
e-mail	Antonio.lopez.farre@med.ucm.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

La tesis presentada aborda de forma específica y, por primera vez, los cambios en el metabolismo energético en la pared de aorta aneurismática frente a la aorta sana a través del estudio proteómico de las muestras obtenidas.

Desde el punto de vista de la forma, está correctamente estructurada. La introducción es concisa en relación a lo estudiado así como la bibliografía. La definición de hipótesis y objetivos se encuentran redactados de forma adecuada

y clara. Los materiales y métodos se encuentran definidos y esquematizados de forma clara para la reproducibilidad de los mismos. Los resultados se exponen adecuadamente. La discusión resume las escasas referencias descritas en la literatura acerca del metabolismo energético de los aneurismas de aorta, con una adecuada valoración conjunta de los resultados obtenidos en este estudio. Las conclusiones se ajustan a los objetivos y motivo de estudio.

Dado lo previamente descrito, la tesis doctoral aquí presentada reúne las condiciones para su defensa ante un tribunal con solvencia.

Madrid, a 27 de Octubre de 2015

Fdo.: A. López Farré



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Manuela M. Hernández Mateo
Título de la Tesis	Alteraciones asociadas al metabolismo de los aneurismas de aorta abdominal: Estudio proteómico
Facultad o Centro	Universidad Complutense de Madrid

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Guillermo Moñux Ducajú
Centro al que pertenece y dirección	Departamento de Cirugía UCM . Hospital Clínico San Carlos
D.N.I./Pasaporte	05276384T
e-mail	gmonux@ucm.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME

Se trata de una tesis doctoral que analiza el metabolismo de la pared aórtica afectada por un aneurisma de aorta abdominal. Se ha estudiado por primera vez este aspecto desde un abordaje inédito como lo es la proteómica

La introducción esta equilibrada y con bibliografía muy de acuerdo a lo esperado.

La definición de hipótesis y objetivos es clara

El material y método esta perfectamente definido y permitiría reproducir con exactitud los experimentos

Los resultados están expuestos y estructurados con claridad

La discusión es adecuada y proporcionada, con aportación de bibliografía adecuada sobre un tema del que hay muy poco escrito
Las conclusiones se ajustan al conjunto del estudio
Por tanto la presente tesis doctoral considero está lista para su defensa ante un tribunal con solvencia.

Madrid, a 23 de Octubre de 2015

Fdo.: G. Moñux Ducajú

Esta tesis doctoral ha sido dirigida por los doctores
Francisco Javier Serrano Hernando, Antonio José López Farré y Guillermo Moñux
Ducajú y financiada por el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social
(Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, Red Heracles RD06/0009/0010) y
Fundación Mutua Madrileña.

A mis padres

A Poli

A quienes comparten mi ilusión

AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas que han hecho posible la presentación de esta tesis, directa o indirectamente, con su apoyo y formación y a todas me gustaría agradecer su participación.

A Javier Serrano, *Jefe*, ejemplo inestimable del buen hacer en esta profesión. A Guillermo Moñux, por su insistencia desde el primer día. A los miembros del Instituto Cardiovascular, Antonio López Farré, Jose y Javier, por brindarme la oportunidad de elaborar el trabajo presentado.

A todos los adjuntos y a “mis resis”, mayores y pequeños, del servicio de Cirugía Vascular del Hospital Clínico San Carlos. Mención especial a Isaac, por su participación activa en el proyecto y por creer en mí, enseñarme y ser mi modelo a seguir; y a Sergio, por ser el mejor resi mayor que hubiese podido imaginar.

A Lola, por su tranquilidad. A Rosalia y Maribel. A Nieves, por sus palabras de ánimo. A todos, gracias.

Y finalmente, no puedo dejar de agradecerle a mi padre su ejemplo y consejos constantes. A mi madre, su apoyo incondicional. Y a mi hermana, el estar a mi lado a pesar de la distancia.

Sin vosotros hubiese sido imposible

ACRÓNIMOS

2-DE: electroforesis bidimensional

AAA: aneurisma de aorta abdominal

Acetil-CoA: acetil coenzima-A

ADP: adenosin difosfato

ATP: adenosin trifosfato

BCA: ácido bicinconínico

CE: células endoteliales

CML: células musculares lisas

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ESI: *ElectroSpray Ionization*

EVAR: *endovascular aortic repair*

F6P: fructosa-6-fosfato

FADH:

G3PDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

G6P: glucosa-6-fosfato

IL-1; IL-4; IL-5; IL-6; IL-10: interleukinas 1, 4, 5, 6, 10

ILT: trombo intraluminal (*intraluminal thrombus*)

IPG: gel de gradiente de pH inmovilizado (*isoelectric focusing gradient*)

LDH: lactato deshidrogenasa

LDL: lipoproteína de baja densidad

MALDI: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteinasas

MS: espectrometría de masas (*mass spectrometry*)

MS/MS: espectrometría de masas en tándem

NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)

PCR: proteína C reactiva

PDVF: polifluoruro de vinilideno

PEP: fosfoenol piruvato

PFK: fosfofructokinasa

RMN: resonancia magnética nuclear

RNS: especies de nitrógeno reactivo

ROS: especies de oxígeno reactivo

SDS-PAGE: gel de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico

TAC: tomografía axial computarizada

TIMP: inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

TNFR: receptores de TNF

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

TOF: *Time of flight*

TPI: triosafosfato isomerasa

UA: unidades arbitrarias

w/v: *weight/ volumen*

WB: *Western Blot*

ÍNDICE

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1. ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL	11
2.1.1. Definición de aneurisma de aorta abdominal	11
2.1.2. Epidemiología	12
2.1.3. Historia natural y relevancia clínica	13
2.1.4. Diagnóstico	15
2.1.4.a. Ecografía abdominal	16
2.1.4.b. Tomografía axial computarizada (TAC)	16
2.1.4.c. Resonancia magnética nuclear (RMN)	17
2.1.5. Tratamiento	18
2.2. ETIOPATOGENIA DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL	20
2.2.1. Anatomía de la aorta sana y aneurismática	21
2.2.1.a. Pared aórtica sana	21
2.2.1.b. Pared aórtica aneurismática	25
2.2.1.c. Hemodinámica de la pared vascular y alteración en los AAA	26
2.2.2. Teorías etiopatogénicas de los AAA	28
2.2.2.a. Teoría aterosclerótica	28
2.2.2.b. Teoría mecánica	33
2.2.2.c. Proteólisis y apoptosis celular	33

2.2.2.d. Teoría inmunogenética-----	37
2.2.2.e. Papel del estrés oxidativo en los AAA-----	39
2.3. METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR -----	41
2.3.1. Glucolisis. Formación de piruvato -----	41
2.3.2. Destinos metabólicos del piruvato-----	45
2.3.2.a. Vía metabólica aerobia. Metabolismo oxidativo: respiración	46
2.3.2.b. Vía metabólica anaerobia. Metabolismo del lactato -----	48
2.3.3. Vía de las pentosas fosfato -----	49
2.3.4. Fuente de glucosa celular. Transportadores GLUT -----	50
2.4. PROTEÓMICA -----	52
2.4.1. Aplicación de la proteómica en los AAA -----	55
3. HIPÓTESIS -----	59
4. OBJETIVOS -----	63
5. MATERIALES Y MÉTODOS -----	67
5.1. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS AÓRTICAS	69
5.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS: ABORDAJE	
PROTEÓMICO-----	70
5.2.1. Fundamentos de la técnica -----	71
5.2.2. Electroforesis bidimensional (2-DE) -----	71
5.2.2.a. Material utilizado -----	72
5.2.2.b. Preparación de las muestras -----	73
5.2.2.c. Primera dimensión-----	74
5.2.2.d. Segunda dimensión-----	79
5.2.2.e. Tinción -----	80
5.2.3. Adquisición y análisis de la imagen -----	81

5.2.4. Espectrometría de masas (MS)	82
5.2.4.a. Material utilizado	84
5.2.4.b. Metodología	75
5.3. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT (WB)	88
5.3.1. Material utilizado	89
5.3.2. Preparación de las muestras	90
5.3.3. Electroforesis en gel	91
5.3.4. Transferencia y bloqueo de proteínas	92
5.3.5. Marcaje de las proteínas	95
5.3.6. Análisis	96
5.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	97
5.4.1. Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa y triosafosfato isomerasa	97
5.4.2. Lactato deshidrogenasa	99
5.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PIRUVATO Y LACTATO	100
5.5.1. Determinación del contenido de piruvato	100
5.5.2. Determinación del contenido de lactato	100
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	101
6. RESULTADOS	103
6.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS	105
6.2. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO	106
6.3. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	111

6.4. MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	113
6.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PIRUVATO Y LACTATO	115
6.6. CORRELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EXPRESIÓN PROTEICA	116
6.7. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON ESTATINAS EN LOS RESULTADOS OBTENIDOS	118
7. DISCUSIÓN	119
7.1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	130
7.2. TRABAJO FUTURO	133
8. CONCLUSIONES	135
9. BIBLIOGRAFÍA	139

1. RESUMEN

ALTERACIONES ASOCIADAS AL METABOLISMO DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL: ABORDAJE PROTEÓMICO

INTRODUCCIÓN

Los aneurismas de aorta abdominal (AAA), con una prevalencia de hasta el 9% en varones mayores de 65 años, se caracterizan por la dilatación de la pared aórtica de forma opuesta a la manifestación oclusiva de la aterosclerosis, con una mortalidad de hasta el 80% en casos de rotura. En las últimas décadas, se han publicado numerosos estudios en relación a la etiopatogenia de entidad, aún en discusión. No obstante, la mayoría de ellos abogan por la inflamación de la pared aórtica y destrucción estructural de la misma como una de las características principales de los mismos. Sin embargo, escasas son las referencias al metabolismo energético celular que permite la consecución de todos los procesos de señalización, transporte y regulación de expresión génica que resultan en dichos cambios estructurales.

Desde el punto de vista analítico, la identificación masiva de las proteínas de una misma muestra es actualmente factible gracias a la tecnología englobada en la proteómica, que incluye el análisis por electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas. Esta aproximación metodológica, aplicada a la salud, permite analizar, cuantificar e identificar los mapas proteicos de una misma muestra y su comparación con otras no afectas de enfermedad.

Por tanto, los objetivos del presente estudio son el análisis de la expresión proteica de las enzimas relacionadas con el metabolismo de la glucosa en el aneurisma de aorta abdominal respecto a la pared aórtica sana mediante un abordaje

proteómico, la determinación de su actividad enzimática, el análisis del contenido de los productos finales de las dos vías metabólicas principales, piruvato y lactato, así como la expresión del transportador principal de glucosa en la pared vascular, GLUT-3.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de aorta aneurismática (grupo AAA) durante la reparación quirúrgica electiva de los aneurismas de aorta abdominal. Las muestras de aorta sana (grupo control) se obtuvieron a partir de donantes con daño cerebral irreversible. Mediante electroforesis bidimensional, espectrometría de masas y Western Blot se identificaron los patrones de expresión proteica diferencial entre ambos grupos en relación al metabolismo energético. La identificación proteica de los puntos diferenciales entre ambos proteomas se realizó en base a su comparación con los publicados para la aorta ascendente humana. La actividad enzimática de las proteínas analizadas se determinó mediante kits comerciales en base al método descrito por *Misset y Opperdoes*. El contenido de piruvato y lactato fue analizado mediante kits comerciales.

RESULTADOS

Se procesaron un total de 25 muestras (grupo AAA n=13; grupo control n=12). La expresión de triosafosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa citosólica se vio reducida en las muestras del grupo AAA respecto al grupo control, así como la actividad enzimática de triosafosfato isomerasa. No hubo diferencias en la actividad de 1,6-bifosfato aldolasa entre ambos grupos pero sí se obtuvo una menor expresión de la piruvato

deshidrogenasa, enzima clave en la entrada del ciclo de Krebs, en el grupo AAA, junto con un incremento del contenido de piruvato. En relación a la vía metabólica anaerobia, se obtuvo un incremento del lactato en las muestras aneurismáticas sin modificarse la expresión o actividad de lactato deshidrogenasa. En las muestras del grupo AAA se identificó una disminución de la expresión del transportador de glucosa GLUT-3.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren una modificación del metabolismo energético de la pared vascular en presencia de enfermedad aneurismática en favor de un estado metabólico anaerobio como fuente energética principal. La reducción de la respiración oxidativa podría estar en relación con las condiciones de hipoxia presente en la pared aórtica aneurismática y característica de entidades inflamatorias crónicas, descrita previamente. Estos hallazgos aportan nueva evidencia acerca del metabolismo aórtico de los AAA y abren nuevas líneas de investigación hacia futuras estrategias terapéuticas.

METABOLIC MODIFICATIONS ASSOCIATED TO ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM SITES: PROTEOMIC ANALYSIS

INTRODUCTION

Abdominal aortic aneurysms (AAA) occur in up to 9% of males over 65 years of age, and are characterized by aortic dilation opposed to the characteristic occlusion of atherosclerotic disease. Mortality rates in case of rupture exceed 80%. Over the last decades, multiple studies have been published regarding AAA pathogenesis, still unclear. Different findings have demonstrated that both degradation of the extracellular matrix accompanied by chronic inflammation are characteristic processes associated to aneurysm formation. However, data regarding energetic metabolism responsible for all signaling reactions, biomolecule transportation and gene expression regulation are scarce.

Molecular technologies involved in proteomics, including two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, have become widely available and allow massive analysis of complex protein mixtures. Thus, proteomics allow us to analyze, quantify and identify a single sample protein expression pattern and its comparison to others.

The aim of the present study was then to analyze the expression of glucose metabolism-related proteins at the aneurysmal site compared to healthy aorta using proteomics, to analyze enzyme metabolic activity, content of both pyruvate and lactate, and to determine the expression of cellular glucose transporter GLUT-3.

METHODS

AAA samples were obtained during elective open aneurysm repair. Control non-aneurysmal abdominal aortic samples were obtained from irreversible brain-damaged organ donors. Two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and Western Blot analysis were used to determine changes in the expression of glucose metabolism-related proteins in both AAA's and control samples. Differential spots on the proteomic maps were identified by comparison with those found published in human ascending aorta. Enzymatic activity was determined following the method described by *Misset and Opperdoes*. The content of pyruvate and lactate were also quantified using commercial assay kits.

RESULTS

A total of 25 samples were processed (AAA n=13; controls n=12). The expression of triosephosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and cytosolic aldehyde dehydrogenase was reduced at the AAA site compared to controls, as well as triosephosphate isomerase activity. No differences were found regarding 1,6-biphosphate aldolase activity although a reduction of pyruvate dehydrogenase expression was observed in AAA samples, in conjunction to increased pyruvate content. Regarding anaerobic metabolism pathways, lactate content was increased at the AAA site without changes in expression and activity in lactate dehydrogenase. Expression of GLUT-3 glucose transport was reduced in AAA compared to controls.

CONCLUSIONS

The present results suggest a modification of the normal aortic energetic metabolism with an anaerobic metabolic state favored at the AAA site. Reduction of the respiratory pathway may be due to hypoxic conditions in the aneurysmal wall, which is predominant in other chronic inflammatory diseases, as previously described. These findings offer new evidence regarding energetic metabolism in AAA and may favor further investigations on clinical strategies.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL

2.1.1. Definición de aneurisma de aorta abdominal

Se define como aneurisma una dilatación localizada y permanente de una arteria que supone un incremento de, al menos, el 50% de su diámetro normal¹. Esta dilatación afecta a las tres capas de la pared aórtica (capa íntima, capa media y adventicia), a diferencia de los denominados “falsos” aneurismas o pseudoaneurismas, en los que se evidencia extravasación de flujo sanguíneo secundaria a la lesión puntual de un vaso, contenido por los tejidos circundantes, por lo que la pared de un pseudoaneurisma no involucra a ninguna de las capas de la pared vascular normal.

Existen varias clasificaciones de los aneurismas aunque la más utilizada es la clasificación etiopatogénica de los mismos, tal y como propone la Sociedad de Cirugía Vascular/Sociedad Internacional de Cirugía Cardiovascular (SVS/ISCVS) a través del subcomité de estándares para la publicación sobre aneurismas arteriales¹. Entre las etiologías definidas, el tipo de aneurisma más frecuentemente visto en la práctica clínica diaria es el denominado degenerativo (tradicionalmente referido como inespecífico o aterosclerótico). La mayoría de estos aneurismas se localizan a nivel aórtico, principalmente a nivel de la aorta abdominal infrarrenal, y sobre los que

versará la presente tesis doctoral. En la práctica clínica, éstos se definen como un diámetro aórtico mayor o igual de 3 cm, basándose en los diámetros medios aórticos derivados de los estudios de cribado o *screening* poblacional, con una media de 2.3 cm en varones y 1.9 cm en mujeres ².

2.1.2. Epidemiología

La existencia de estudios de cribado poblacional ofrece la mejor evidencia de la prevalencia de los aneurismas de aorta abdominal (AAA), dado que muchos de ellos consisten en estudios aleatorizados. Esta entidad afecta fundamentalmente a pacientes mayores de 50 años, con una prevalencia estimada de un 3-10% en la población en el mundo Occidental ³, observándose un incremento de la misma en las últimas décadas, como reflejan trabajos en Suecia ⁴ y Estados Unidos ⁵.

Los factores de riesgo asociados a la existencia de un AAA son, fundamentalmente, la edad avanzada, el sexo masculino, siendo la prevalencia de 2 a 6 veces mayor en los hombres ^{6, 7, 8}, y el tabaquismo. Éste último supone el factor extrínseco más comúnmente relacionado con la existencia de un AAA, con un OR asociado mayor de 3 en casi todos los estudios, siendo de hasta 5.1 en el registro publicado en el año 2000 por Lederle ⁹, que incluía un total de 52.745 veteranos estadounidenses con edades comprendidas entre los 50 y 79 años en un programa de cribado ecográfico. Este riesgo asociado al tabaquismo se incrementa de forma significativa en función de los años de hábito tabáquico.

Otros factores relacionados con los AAA son la historia familiar de

aneurismas ¹⁰, hipertensión ^{9, 11, 12, 13}, hipercolesterolemia ⁷, enfermedad coronaria ¹⁴ y aterosclerosis ⁹ entre otros, aunque estos datos son inconsistentes en la literatura.

2.1.3. Historia natural y relevancia clínica

La enfermedad aneurismática cursa habitualmente de forma asintomática y son detectados de forma incidental durante un estudio de imagen abdominal no relacionado con la patología aórtica. De forma general, la evolución natural de los AAA es el crecimiento progresivo del mismo hasta su rotura, aunque cabe destacar la variabilidad interpersonal.

El crecimiento medio estimado de los AAA entre 30 y 55 mm varía de 2 a 3 mm/año, siendo mayor el crecimiento a mayor diámetro inicial objetivado (4,1 mm/año cuando los aneurismas miden entre 40 y 50 mm y de 5,1 mm/año si son mayores de 50 mm) ¹⁵. Diversos estudios refieren factores relacionados con el crecimiento, entre los que vuelve a destacar el tabaquismo ¹⁶, por lo que una de las recomendaciones recogidas en la última guía de la Sociedad Europea de Cirugía Vascular (ESVS) ¹⁷ (nivel de evidencia 2b, grado B), sería el abandono del hábito tabáquico con el objetivo de reducir el riesgo de crecimiento de los AAA. Por el contrario, datos relacionados con otra enfermedad de gran prevalencia en la población occidental como la diabetes, sugieren una asociación negativa para la existencia y crecimiento de los AAA ^{18, 19}. En relación al efecto de las estatinas, varios estudios ^{20, 21, 22, 23} (tanto experimentales *ex vivo* como estudios clínicos) relacionan su uso con un menor crecimiento de los AAA debido a la disminución de la secreción de proteínas proinflamatorias incluyendo la metaloproteinasa-9 ²⁴, de gran importancia en las

teorías patogénicas actuales como se detallará en apartados posteriores. No obstante, otros trabajos mantienen la controversia del efecto terapéutico de las estatinas sobre los AAA en humanos, como el del grupo de Fergusson²⁵ que incluye 652 pacientes de 5 centros independientes con AAA de pequeño tamaño con seguimiento ecográfico durante una media de 5 años, y en el que no se objetivó beneficio sobre el crecimiento de los AAA en relación con la prescripción de estatinas.

Aunque entre las complicaciones potenciales de los AAA se incluyen la embolización distal, disección, infección y trombosis, es el riesgo asociado de rotura la principal indicación y justificación de tratamiento ante la existencia de un AAA.

Se estima que la rotura de los aneurismas de aorta abdominal supone la decimoquinta causa de muerte y la décima causa de muerte en varones mayores de 55 años en Estados Unidos^{26, 27} con un 30-50% de pacientes fallecidos antes de su llegada a un centro de atención hospitalaria y una mortalidad global asociada a esta entidad del 80%²⁸.

Durante las últimas 5 décadas el principal factor determinante del riesgo de rotura de los AAA ha sido el diámetro máximo del aneurisma. Previo a la reparación expandida de los AAA, varios trabajos como los de Brewster²⁹, Foster³⁰ o Conway³¹ reflejaron el riesgo de rotura en función del diámetro aneurismático, con unas tasas de rotura al año crecientes de forma exponencial, según refleja la Tabla 2.1.

No obstante, algunos aneurismas se rompen con diámetros menores y algunos de gran tamaño crecen sin romperse, por lo que otros factores, como el sexo femenino

³², la tasa de crecimiento rápida, el incremento de trombo intraluminal ³³, la forma del aneurisma (sacular frente a fusiforme) y la historia familiar también parecen favorecer la rotura. Recientemente, el uso de la imagen y el análisis de elementos finitos que permite un estudio detallado de las características biomecánicas de los aneurismas de aorta, así como la identificación de áreas de mayor actividad metabólica, pretenden predecir no sólo el riesgo de rotura de un paciente con AAA, sino del segmento aórtico con mayor predisposición a tal evento ^{34, 35}. Sin embargo, en espera de estudios multicéntricos que los validen, el diámetro máximo del aneurisma continua siendo por el momento el principal determinante del riesgo de rotura y el factor más importante, dependiente del aneurisma, a la hora de sentar la indicación quirúrgica.

Tabla 2.1: Riesgo de rotura aórtica a 12 meses en función del diámetro del AAA.

Diámetro AAA (mm)	Riesgo de rotura (%)
30-39	0
40-49	1
50-59	1-11
60-69	10-22
>70	30-33

Adaptado de la Guía de Práctica Clínica en el manejo de los aneurismas de aorta abdominal de la Sociedad Europea de Cirugía Vascular (ESVS) ¹⁷.

2.1.4. Diagnóstico

Dado que la mayoría de los aneurismas de aorta abdominal son asintomáticos, el diagnóstico suele realizarse de forma incidental mediante una prueba de imagen solicitada por otro motivo. Es posible sospechar la presencia de un aneurisma tras una detallada historia clínica (es más frecuente en varones mayores de

50 años, fumadores e hipertensos, especialmente si existen antecedentes familiares de patología aneurismática aórtica) o mediante la palpación de una masa pulsátil en el mesogastrio. Sin embargo, la sensibilidad de la palpación abdominal depende del tamaño del aneurisma, de la obesidad del paciente y de la habilidad del explorador, variando del 29% en aneurismas entre 3 y 3.9 cm hasta el 75% en los aneurismas mayores de 5 cm^{36, 37}.

No obstante, se requiere de técnicas de imagen, no sólo para la confirmación diagnóstica, sino como herramienta para la planificación quirúrgica, en caso de precisarla, o su seguimiento.

2.1.4.a. Ecografía abdominal.

La ecografía abdominal constituye el método diagnóstico más barato, menos invasivo y más frecuentemente utilizado, sobre todo en la confirmación diagnóstica y en el seguimiento de los aneurismas de pequeño tamaño en pacientes asintomáticos³⁸. Tiene una sensibilidad y especificidad cercana al 100%³⁹ aunque presenta, como principal inconveniente, una variabilidad inter-observador de aproximadamente 5 mm. Asimismo, tiende a infraestimar el tamaño máximo del aneurisma entre 2 y 4 mm cuando se compara con la TAC⁴⁰.

2.1.4.b. Tomografía axial computarizada (TAC).

La TAC abdomino-pélvica con contraste yodado supone una técnica rápida y reproducible que aporta los detalles anatómicos de una forma precisa para la

planificación quirúrgica ⁴¹, incluyendo la valoración de estructuras circundantes, afectación vascular a otros niveles y la identificación de aneurismas inflamatorios. En la actualidad supone la prueba preoperatoria de elección en la mayor parte de los centros ¹⁷. Actualmente se utilizan TAC helicoidales multiplanares, con *software* especializados en la reconstrucción tridimensional e imagen dinámica (Figura 2.1). Su principal inconveniente es la radiación ionizante y la necesidad de contraste intravenoso con el consiguiente riesgo de nefropatía por contraste.



Figura 2.1: TAC preoperatorio de un AAA. Corte coronal, axial y reconstrucción tridimensional.

2.1.4.c. Resonancia magnética nuclear (RMN).

La RMN proporciona una buena información anatómica, con diferenciación de las distintas partes blandas. La adición de contraste intravenoso (gadolinio) mejora

la visualización del árbol arterial, con la posibilidad de valorar el movimiento de la pared arterial, el flujo y la luz vascular. Sin embargo, esta prueba no se encuentra disponible en todos los centros, está contraindicada en pacientes claustrofóbicos, es muy susceptible a los artefactos y la adquisición de imágenes consume más tiempo que el TAC.

Tanto la disponibilidad del TAC como de la RMN han relegado a la arteriografía como método de imagen intraoperatorio en el tratamiento endovascular, no siendo útil en el diagnóstico preoperatorio ni como herramienta, en la actualidad, de planificación quirúrgica.

2.1.5. Tratamiento

Hasta el momento, la única alternativa terapéutica en los AAA es la quirúrgica. A pesar de los avances en el conocimiento de su etiopatogenia, como se verá a continuación, no existe farmacoterapia disponible para la resolución de esta entidad.

Como se ha expuesto previamente, la principal complicación de los AAA es su rotura, con una elevada mortalidad, a pesar de los avances en el manejo perioperatorio de estos pacientes. Dado que el principal factor de riesgo de rotura reconocido es el diámetro aneurismático, el manejo de los pacientes con AAA dependerá de éste y del balance entre la probabilidad de dicho evento y el riesgo quirúrgico individualizado ¹⁷.

En base a los datos obtenidos de los grandes ensayos clínicos ^{42, 43, 44} se consideran subsidiarios de tratamiento quirúrgico aquellos pacientes con AAA ≥ 55 mm, tal y como reflejan las guías europea ¹⁷ y americana ⁴⁵ de las Sociedades de Cirugía Vascular, siendo modificable esta recomendación en presencia de factores como el sexo femenino, tabaquismo activo, anatomía aneurismática y la esperanza de vida del propio paciente.

En resumen, existen dos abordajes quirúrgicos en los AAA: 1) la cirugía abierta convencional, que consiste en la resección aneurismática e interposición de un injerto protésico y 2) el tratamiento endovascular (EVAR, *endovascular aortic repair*), con la implantación de una endoprótesis, habitualmente mediante abordaje transfemoral, que excluye el AAA de la circulación general.

Desde la introducción del EVAR hace más de dos décadas, éste se ha convertido en la terapia de elección en muchos centros, con un incremento del hasta el 600% en el número de procedimientos realizados en Estados Unidos desde el año 2000 ⁴⁶. Avalado por los excelentes resultados y una menor morbilidad en relación a la cirugía abierta convencional ⁴⁷, con tiempos quirúrgicos reducidos, menor invasividad y reducción de la estancia postoperatoria, la experiencia creciente en el área endovascular ha permitido ampliar no sólo el número de pacientes candidatos a la reparación, sino el espectro anatómico incluyendo extensiones a nivel suprarrenal y toracoabdominal (prótesis ramificadas y fenestradas). No obstante, este beneficio desaparece a medio y largo plazo, dada la mayor necesidad de reintervenciones secundarias, en su mayor parte, a endofugas, por lo que el tratamiento óptimo sigue siendo motivo de debate, sobre todo en el caso de pacientes

jóvenes, con escasa comorbilidad y anatomía favorable para EVAR en los que la cirugía convencional puede ser definitiva.

2.2. ETIOPATOGENIA DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL

Tal y como se ha descrito previamente, los AAA se caracterizan por el deterioro estructural localizado a nivel de la pared aórtica que conlleva una dilatación permanente y progresiva cuya complicación más temida es la rotura, con una elevada mortalidad asociada, estable en las últimas décadas.

A pesar de suponer una de las causas más frecuentes de morbimortalidad dentro de la patología vascular, con un desarrollo tecnológico intensivo, gran inversión económica y grandes avances en el tratamiento quirúrgico, su etiopatogenia persiste desconocida en su totalidad, con aspectos que siguen siendo materia de discusión. Varios factores epidemiológicos ya bien establecidos se asocian a la existencia de enfermedad aneurismática, como se describe en apartados previos, pero pocos han sido los elementos demostrados como propiamente causales.

Dicha determinación causal es de gran importancia clínica, con el objetivo de elucidar medidas preventivas y tratamientos que pudieran evitar su aparición, crecimiento y, por tanto, rotura.

2.2.1. Anatomía de la aorta sana y aneurismática

De forma previa a la exposición de los múltiples mecanismos etiopatogénicos de los AAA considerados en la actualidad, cabe definir los aspectos anatómicos y funcionales que se encuentran tanto en la aorta sana como en la aneurismática.

2.2.1.a. Pared aórtica sana.

La pared vascular de todo el árbol arterial posee una composición y estructura común estando conformada por un tejido conectivo organizado en el que se incluyen células y una matriz de fibras dispuestas en tres capas: íntima, media y la adventicia. No obstante, la proporción de los componentes puede variar en las distintas regiones del árbol vascular.

- Capa íntima: constituye la capa más interna del vaso y se extiende desde la luz hasta la lámina elástica interna. Está compuesta por el endotelio, una capa subendotelial de tejido conjuntivo y una capa elástica o fenestrada.

Endotelio: está constituido por una serie de células poligonales en contacto directo con el torrente sanguíneo, conformando una superficie lisa y regular. Además de una barrera física, participa de forma activa en procesos fisiológicos y patológicos al reaccionar a fuerzas mecánicas e intervenir en la mediación química e inmunológica ⁴⁸, constituyendo un importante regulador del tono vasomotor, hemostasia, permeabilidad y proliferación celular ⁴⁹. Las células endoteliales (CE) están recubiertas por el glucocáliz, responsable de

las propiedades antitrombóticas del endotelio ⁵⁰, y se encuentran típicamente alineadas en la dirección del flujo sanguíneo. Las uniones entre ellas son de gran importancia como fuerza mecánica y de permeabilidad. Existen zonas de unión firme entre las células (occludens-uniones herméticas) y zonas denominadas adherens (uniones adherentes). Las primeras constituyen una barrera de transporte entre las células endoteliales y ayudan a mantener la polaridad de la membrana. Por el contrario, las uniones adherentes son menos frecuentes y se encuentran sobre todo en arterias de gran calibre, cuyo principal papel consiste en permitir la comunicación intercelular en el endotelio mediante el transporte de iones, metabolitos y factores reguladores ⁵⁰.

Para mantener la fluidez de la sangre, las CE expresan una serie de factores que mantienen la regulación de la formación de coágulo en caso de daño en la integridad de la pared vascular, en relación a la superficie aniónica proporcionada por la alta proporción de heparán sulfato y condroitín sulfato. Las células previenen la agregación plaquetaria a través de la actividad ADP-asa de la superficie, la síntesis de prostaglandinas y la liberación de óxido nítrico (NO). El normal funcionamiento de este sistema permite un balance entre los mecanismos pro y antitrombóticos en favor de la anticoagulación.

Lámina basal: inmediatamente adyacente al endotelio, actúa como soporte mecánico y de regeneración de las CE. Esta membrana posee un papel fundamental en la permeabilidad vascular, está involucrada en la formación del trombo y constituye una barrera para la migración celular ⁵¹. Supone una sección especializada de la matriz extracelular (MEC) conectando el endotelio

con las células subyacentes y células musculares lisas (CML) y está formada por glicoproteínas, moléculas de adhesión como laminina, fibronectina, entactina y tromboespondina, proteoglicanos como heparin sulfato y microfibrillas de colágeno tipo IV y V ⁵². El endotelio es el responsable de la secreción y depósito del colágeno tipo IV que forma la lámina basal. Durante el funcionamiento normal, la monocapa de endotelio se encuentra en un estado quiescente y las uniones intercelulares inhiben la proliferación, lo que resulta en un bajo índice mitótico y contribuye a la estabilidad e integridad de la pared vascular ⁴⁸.

La capa reticular inmediatamente subyacente al endotelio se compone de colágeno tipo I y III, producido por ambas CE y CML. De todos los tipos de colágeno intersticial, los tipos I y III son los predominantes, siendo el tipo I el mayoritario en las capas íntima y media de la aorta humana.

Lámina elástica interna: compuesta por fibras elásticas conforma una banda circular en la sección transversa de la íntima. La elastina se organiza en unas láminas cilíndricas con fenestraciones separadas unas de las otras por capas simples de CML, que permiten el paso de macromoléculas. En las arterias de gran calibre, la lámina elástica interna funciona como barrera para la acumulación de macromoléculas en la pared vascular, por lo que defectos estructurales de la misma se ven implicados en el engrosamiento intimal de las arterias en el ser humano ⁵³.

- Capa media: se extiende desde la lámina elástica interna hasta la adventicia, porosa y heterogénea, y está constituida por CML, elastina y fibras de colágeno perfectamente ordenadas ⁵⁴. Las capas de CML forman grupos de

células con una orientación similar, rodeados por una lámina basal común en íntima relación con un entramado de fibras de colágeno tipo III. Este sistema altamente integrado implica que un elemento no puede extenderse sin extensión de otro. La principal función de las CML consiste en mantener una presión y flujo normales en los vasos sanguíneos mediante el control del calibre de los mismos por contracción y relajación. Son responsables de la remodelación vascular, proliferación, migración y expresión proteica. Sintetizan componentes como el colágeno, la elastina, glicoproteínas y proteoglicanos, que contribuyen a la elasticidad de la pared vascular.

- Capa adventicia: La adventicia se extiende desde la lámina elástica externa hasta el tejido conectivo perivascular contiguo, difícil de definir. Esta capa varía en grosor entre las distintas arterias, siendo mínima en la aorta, con un contenido en células escaso siendo los fundamentales exponentes los fibroblastos.

Esta capa contiene los *vasa vasorum* y estructuras nerviosas, que proporcionan nutrición a la adventicia y contribuyen a la regulación de la función de las CML de la capa media, respectivamente. El oxígeno y nutrientes necesarios para el metabolismo de la pared arterial proceden de la propia luz vascular, mediante difusión, y del aporte procedente de los *vasa vasorum*. Las fibras vasomotoras inducen vasodilatación mediante receptores β adrenérgicos y vasoconstricción mediante α adrenérgicos. El estímulo nervioso se transmite a las CML más externas mediante uniones neuromusculares y, posteriormente, la señal es transmitida a las más internas por señales eléctricas entre células adyacentes.

2.2.1.b. Pared aórtica aneurismática.

Como se explicará a continuación, existen varias teorías acerca de la etiopatogenia de los AAA y, anatómicamente, se ven implicadas las tres capas de la pared vascular.

En primer lugar, las células endoteliales que conforman la capa íntima de la pared vascular pueden contribuir a la aparición de un aneurisma mediante la producción de especies de oxígeno reactivo (acrónimo en inglés ROS). Existen referencias a una desestructuración y disfunción endotelial ⁵⁵ con la presencia de trombo intraluminal (ILT, *intraluminal thrombus*) conformando una neocapa biológicamente activa, de estructura laminar y alto contenido en hemoglobina y eritrocitos. La hemaglutinación favorece la liberación de hemoglobina libre y formación de fibrina secundaria a la activación plaquetaria. La presencia de ILT se ha asociado a mayor desestructuración de la pared ⁵⁶, elastolisis, menor densidad de CML y mayor inflamación de la adventicia ⁵⁷.

No obstante, es en la capa media aórtica donde se encuentra la mayor destrucción estructural objetivada en los AAA. Como es conocido, la matriz extracelular de la media contiene elastina, colágenos tipo I y III y proteoglicanos, así como CML organizadas en unidades funcionales (lamelas). Estas unidades, las principales estructuras de carga de la aorta sana, se ven mermadas en la patogénesis de la enfermedad aneurismática. En los estados avanzados de enfermedad, la degradación de elastina incrementa la rigidez y carga de colágeno y la rotura aórtica

ocurre cuando las capas media y adventicia residuales fracasan en el mantenimiento de la integridad estructural. La secuencia precisa de los eventos que conllevan la rotura de la pared aórtica se desconocen, pero parecen involucrar la inflamación de la capa media y proteólisis de la misma, con un índice apoptótico elevado de las CML.

Por último, la adventicia, compuesta por colágeno intersticial, fibroblastos, fibras nerviosas y los *vasa vasorum*, constituye una parte activa en la patogénesis de los aneurismas. Esta capa reacciona a los insultos externos mediante una respuesta angiogénica, immuno-inflamatoria y fibrótica ⁵⁸. Un incremento en la formación neocapilar o “neovascularización” de la adventicia se ha identificado en algunos estudios en muestras obtenidas intraoperatoriamente durante la reparación quirúrgica de AAA de forma electiva y en situaciones de rotura, siendo mayor en las regiones de pared aórtica rota ⁵⁹. No obstante, aún se desconoce si esta neovascularización es un promotor activo de la enfermedad aneurismática o consecuencia de la inflamación mural progresiva descrita.

2.2.1.c. Hemodinámica de la pared vascular y alteración en los AAA.

Los vasos sanguíneos están expuestos de forma continuada a fuerzas mecánicas en forma de estrés circunferencial y fuerzas de cizallamiento (*shear stress*). La presión arterial, con sus oscilaciones sistólicas y diastólicas, es el principal determinante del estrés cíclico o circunferencial, con fuerzas radiales y tangenciales ejercidas sobre la pared de un vaso, representando su deformidad rítmica y constante, afectando a todos los tipos celulares de la misma. En el caso de las fuerzas de cizallamiento, éstas resultan del choque del flujo sanguíneo sobre la superficie del

vaso actuando de forma paralela al mismo y afectando de forma predominante a las CE en la interfase sangre-pared vascular. El estrés normal al que está sometida la pared vascular deriva, por tanto, de la presión pulsátil y el flujo variable durante el ciclo cardíaco. Las CE son las afectadas en un primer tiempo, mientras que los cambios a largo plazo, por una agresión mantenida, pueden afectar a la totalidad de la pared vascular. Estos cambios producen una redistribución de las fibras intracelulares así como variaciones en su cantidad. En el caso de los AAA, las fuerzas tangenciales sobre una pared debilitada pueden derivar en la formación de una dilatación permanente del vaso.

Asimismo, debemos recordar que el flujo a nivel de un vaso sanguíneo es de tipo pulsátil, discurre por un circuito cerrado formado por elementos (vasos) distensibles con un fluido circulante pseudoplástico (sangre: líquido y elementos formes celulares). Dado que la sangre supone un fluido que presenta una resistencia (viscosidad), éste se desplaza como capas concéntricas que se deslizan unas sobre otras en lo que se denomina flujo laminar, de modo que la velocidad de las partículas aumenta desde la pared al centro del vaso. Cuando el patrón de flujo se caracteriza por la presencia de vectores de velocidad aleatorios y no paralelos, existe una reducción en la energía cinética del fluido en lo que se denomina flujo turbulento (Figura 2.2). Aplicado a los AAA, la dilatación de la pared vascular induce un flujo lento, turbulento, que favorece la formación de una capa de trombo que intenta mantener un diámetro del vaso similar al normal. No obstante, este trombo intraluminal no disminuye el estrés parietal sobre el vaso en los AAA ⁶⁰ pero sí contribuye a un estado hipóxico en la misma ⁵⁶.

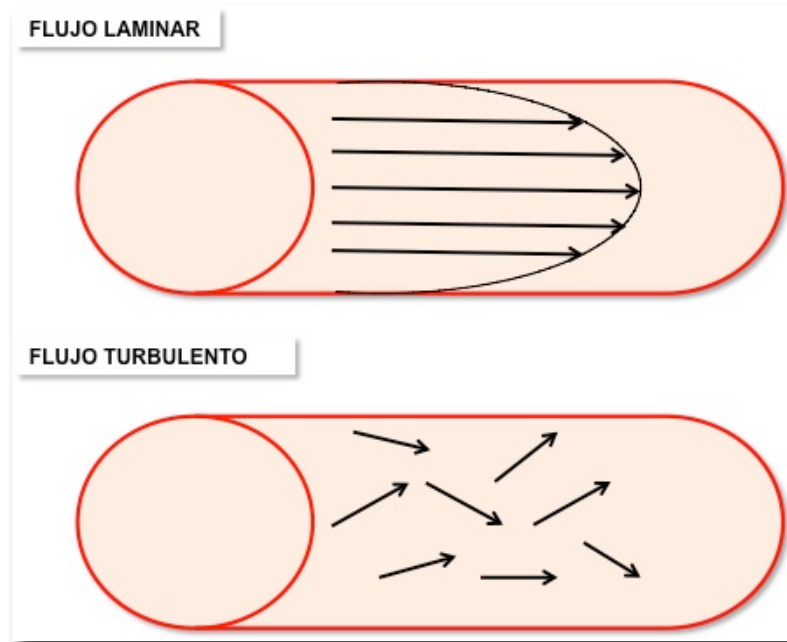


Figura 2.2: Esquema de los distintos patrones de flujo sanguíneo. Cuando existe flujo laminar, las distintas capas del fluido discurren de forma paralela, siendo la velocidad máxima en el centro del cilindro y nula a nivel de la pared del vaso. Los vectores de velocidad aleatorios son característicos del flujo turbulento.

2.2.2. Teorías etiopatogénicas de los AAA.

2.2.2.a. Teoría arterioesclerótica.

Tradicionalmente, los AAAs se han asociado a la aterosclerosis sistémica, aunque la dilatación de la pared aórtica difiere de la característica oclusión de la luz vascular de la enfermedad arterioesclerótica. Tal es así, que los aneurismas inespecíficos referidos en esta tesis eran clásicamente denominados “aterioescleróticos”.

La arterioesclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica que consiste en una compleja serie de eventos entre los que se encuentran la proliferación y migración celular, el depósito intimal de lípidos, la inflamación, la fibrosis y la

necrosis que va a dar lugar, finalmente, a la formación de la placa arterioesclerótica como respuesta a un daño endotelial ⁶¹. Cuando ésta se forma, las arterias tienden a compensar la disminución en la luz arterial con una remodelación que lleva al crecimiento de la misma para intentar mantener su diámetro ante el crecimiento de la placa. Este hecho ha sido demostrado en las arterias coronarias, carotídeas, aorta abdominal y arterias femorales superficiales de humanos ^{62, 63}.

No obstante, esta teoría está siendo abandonada a la luz de los resultados de estudios más recientes en los que se considera la aterosclerosis como un proceso secundario en los aneurismas ⁶⁴. Una posible explicación para los hallazgos de arterioesclerosis en los aneurismas de aorta abdominal infrarrenal es que, a medida que el vaso se dilata, se producen alteraciones del flujo laminar en la superficie interna del aneurisma, lo que condicionaría la proliferación subintimal. Esto daría lugar a la formación de la placa arterioesclerótica, de la misma manera que ocurre en las bifurcaciones arteriales, que es el lugar donde más frecuentemente asientan las lesiones arterioescleróticas ⁶⁵.

Esta asociación entre ambas entidades, se explicaba, en parte, por la relación epidemiológica entre los pacientes con AAA que presentan algún grado de enfermedad arterioesclerótica oclusiva en el territorio coronario, carotídeo y en los miembros inferiores así como los factores de riesgo comunes entre ambas enfermedades. Sin embargo, existen diferencias entre ambos grupos:

- La hipertensión puede tener un efecto directo sobre la dilatación de un vaso que se encuentra predispuesto por su debilidad, de forma independiente al

efecto de proliferación subintimal que es típico de la degeneración arterioesclerótica^{66, 67}.

- El tabaco puede tener un efecto independiente mediante la inhibición de determinados factores antiproteolíticos que protegen la matriz como la α 1-antitripsina⁶⁶.
- Aunque los niveles de colesterol se encuentran elevados en los pacientes con aneurismas inespecíficos de aorta abdominal, constituyendo un factor de riesgo en series largas, el 60% de los pacientes presentan niveles inferiores a 240 mg/dl y el 40% niveles inferiores a 215 mg/dl, niveles medios muy inferiores a los obtenidos en los pacientes que presentan arterioesclerosis⁶⁶.
- En comparación con los pacientes que presentan enfermedad oclusiva del sector aortoiliaco, los pacientes con aneurismas de aorta abdominal presentan una edad media superior, afectan con mayor frecuencia a hombres y presentan menos enfermedad oclusiva periférica⁶⁸.
- Los pacientes con aneurismas de aorta abdominal se encuentran asociados a determinadas patologías independientes de la arterioesclerosis, como las hernias inguinales y al enfisema, lo cual puede indicar la presencia de determinadas condiciones patológicas sistémicas independientes de la arterioesclerosis^{69, 70, 71}.
- La presencia de aneurismas en otras localizaciones (ilíacos, femorales, poplíteos e intracraneales) se asocia con mayor frecuencia a pacientes con aneurisma de aorta abdominal que a pacientes con arteriosclerosis obliterante⁶⁹.

- Estudios poblacionales indican que la incidencia de aneurismas de aorta abdominal está aumentando, mientras que la incidencia de enfermedad arterioesclerosa del sector aortoiliaco está disminuyendo^{19, 72, 73}.

Tal y como se exponía previamente, existen hallazgos macro y microscópicos que relacionan la aterosclerosis y los AAA. Sin embargo, en los años 90, el grupo de Koch⁷⁴ puso de manifiesto diferencias significativas entre ambas también desde un punto de vista anatomopatológico, siendo más patentes al realizar estudios inmunohistoquímicos. Las diferencias quedan esquematizadas en los siguientes puntos:

- Desde el punto de vista microscópico, la arterioesclerosis aórtica oclusiva se caracteriza por la presencia de placas arterioescleróticas localizadas en la íntima, con una media que se encuentra afectada por una reacción inflamatoria y con escasa o nula afectación de la adventicia. En los aneurismas de aorta abdominal se puede observar cómo la íntima está pobremente conservada y muy atrófica, la media se encuentra conservada aunque atrófica, existiendo una gran afectación de la adventicia, donde reside una intensa reacción inflamatoria. Existe asimismo una disminución marcada de CML en la capa media.
- Cuando se analiza la reacción inflamatoria en ambos tipos de afectación aórtica, puede observarse cómo en la arterioesclerosis aórtica el infiltrado inflamatorio es mucho menor que en los casos de AAA, y que además se localiza fundamentalmente en la media, frente a la adventicia en los AAA. Además, al estudiar las subpoblaciones de linfocitos, se observa cómo en la

arterioesclerosis aórtica predominan la presencia de linfocitos T con un índice CD-4+/CD-8+ de 4:1, práctica ausencia de linfocitos B, que además se localizan en la adventicia, y presencia de macrófagos en mucha menor cuantía que en los AAA y que se ubican principalmente en la placa arterioesclerótica. En los especímenes de aneurisma de aorta abdominal se encuentra un infiltrado inflamatorio mucho más intenso y que se localiza en la adventicia. Los linfocitos T representan un porcentaje menor del infiltrado inflamatorio en comparación con la arterioesclerosis y además presentan un índice CD-4+/CD-8+ de 7:1 (mayor cantidad de linfocitos T-helper proporcionalmente respecto a aorta arterioesclerótica). Los linfocitos B tienen una presencia importante, constituyendo el 25-30% del infiltrado inflamatorio, y los macrófagos se encuentran distribuidos de forma similar entre media y adventicia pero en cantidad superior a la arterioesclerosis aórtica (Figura 2.3).

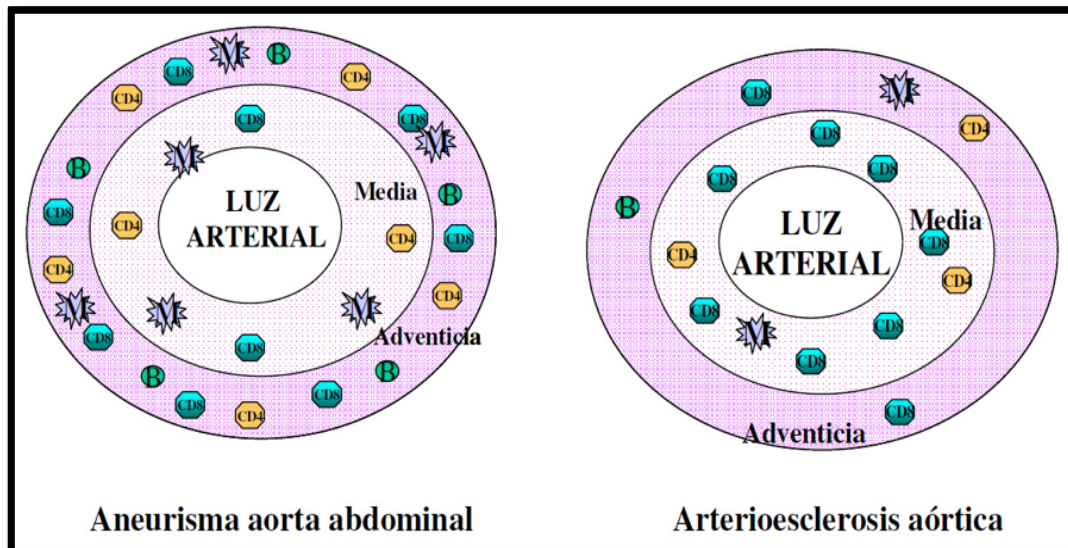


Figura 2.3: Diferencias en las poblaciones y localización de las células inmunes en la pared de la aorta afectada por arterioesclerosis y por AAA. Tomado de: Moñux Ducajú G. Papel de la autoinmunidad en la génesis de los aneurismas de aorta abdominal. Estudio inmunogenético [tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2003.

2.2.2.b. Teoría mecánica.

Las fuerzas hemodinámicas a nivel aórtico, transmitidas por el flujo pulsátil, son factores principales en la degeneración aneurismática y rotura final de la pared vascular. En el caso de la porción abdominal de la aorta humana, existen características peculiares que la hacen más susceptible a las condiciones hemodinámicas y que pueden explicar la incidencia, 5 veces superior, de los aneurismas a nivel abdominal frente a la aorta torácica.

En primer lugar, la aorta abdominal presenta una cantidad mucho menor de *vasa vasorum* en su pared, lo que da lugar a un déficit de nutrientes respecto a la aorta torácica. De igual forma, la pared de la aorta torácica presenta un número de lamelas (unidades funcionales) que soportan una tensión local de 2000 dynas/cm, que es lo habitual entre otras especies de mamíferos. Sin embargo, en la aorta abdominal el número de lamelas está muy disminuido y esto hace que deban soportar una tensión local de 3000 dynas/cm, es decir, un 50% más que en la aorta torácica⁷⁵.

La unión de este factor físico a la disminución de nutrientes con los subsecuentes cambios metabólicos en la pared puede dar lugar a la aparición de una debilidad local que predisponga al desarrollo de aneurismas en esta localización.

2.2.2.c. Proteólisis y apoptosis celular.

Frente al concepto clásico de un origen aterosclerótico de los AAA, a mediados de los 80 comenzaron a aparecer estudios que proponían mecanismos

diferentes en la patogenia de los AAA en base a las diferencias anatomopatológicas encontradas entre la arterioesclerosis aórtica y los AAA, como se ha referido previamente, y para explicar el papel predominante de las metaloproteinasas en la patogenia de éstos.

1. *Papel de las metaloproteinasas*

Las metaloproteinasas (MMP) son un grupo de enzimas de la matriz extracelular esenciales en los procesos fisiológicos homeostáticos como la remodelación tisular y resorción ósea. Éstas son secretadas por neutrófilos, macrófagos, fibroblastos y CML de la pared vascular en forma de zimógeno o precursor pro-MMP. Su activación enzimática está mediada por proteasas extracelulares como plasmina, activador del plasminógeno y otras MMPs. Por el contrario, los mecanismos de inhibición incluyen agentes quelantes e inhibidores tisulares (del inglés *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP).

En las últimas décadas, diversos estudios han demostrado su implicación en la patogénesis de los AAA ⁷⁶, con resultado de la disolución de la matriz extracelular y debilidad de la pared aórtica. Se han descrito varias MMPs implicadas en los AAA, como MMP-1, 2, 3, 8, 9, 12 y 13. Entre ellas, las más específicas relacionadas con los AAA son las siguientes:

- MMP-2 (Gelatinasa A): Degrada la elastina. Se localiza sobre todo en la media y en la adventicia, donde existen placas de ateroma. Se ha encontrado en las muestras de pacientes portadores de un AAA, sobre

todo de pequeño tamaño ⁷⁷ pero no en aortas sanas ni afectadas por enfermedad oclusiva ⁷⁸.

- MMP-9 (Gelatinasa B): Es una proteína de 92 kDa que degrada la elastina, colágeno tipo IV y I y el fibrinógeno. Se produce principalmente en los macrófagos de la adventicia y se piensa que es la principal de las MMPs en la patogenia de los AAA así como en la progresión de los mismos ⁷⁹. Al igual que la MMP-2, se ha encontrado en muestras de aneurismas de aorta abdominal pero no en aortas sanas ni afectadas por enfermedad oclusiva. Datos experimentales sugieren una relación sinérgica y codependientes de estas dos principales MMPs dado que ambas deben estar presentes y activadas para alcanzar una progresión máxima del AAA ⁸⁰.

Las TIMP, por el contrario, comprenden un grupo de cuatro proteínas inhibidoras de las MMP: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4. Éstas se consideran los principales reguladores de la actividad de las MMP a nivel tisular, entre otras funciones. Estructuralmente, constituyen moléculas con dos dominios, uno C-terminal de unos 125 aminoácidos y otro N-terminal, con 65 residuos, estabilizados mediante tres enlaces di-sulfuro ⁸¹. Factores importantes en la interacción de las MMP y TIMP son su gran afinidad y la especificidad diferencial entre las TIMP por unas determinadas MMP a pesar de una elevada similitud en la secuenciación génica de las mismas ⁸². Así, TIMP-2 se une firmemente al zimógeno proMMP-2 ^{83, 84} formando un complejo activador de la MMP-2, mientras que TIMP-1 forma un complejo específico con proMMP-9 ⁸⁵. Atribuido en parte a diferencias estructurales, queda aun lejos el conocimiento preciso de estas diferencias entre TIMP y sus MMP, junto con la

implicación de las mismas en muchos otros procesos biológicos no necesariamente relacionados con la proliferación celular⁸².

2. *Apoptosis celular*

Otro de los factores analizados en la patogenia de los AAA es la depleción pronunciada de CML en la pared aórtica en estados avanzados de la enfermedad, en relación a un incremento de la apoptosis celular, o muerte celular programada, quedando las CML restantes, viables, aunque con capacidad proliferativa disminuida.

Este mecanismo de muerte celular o apoptosis difiere de la necrosis en que constituye un complejo sistema ordenado, mediado por una cascada de enzimas denominada caspasas, sometido a un control extra e intracelular que se resume a continuación:

- La vía extrínseca de la apoptosis involucra interacciones mediadas por receptores transmembrana, miembros de una familia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNFR). Los modelos FasL/FasR y TNF- α /TNFR1 son los que mejor caracterizan los eventos de la vía extrínseca. Ambos convergen en la formación de un complejo de muerte inducida que activa la cascada de las caspasas iniciándose la fase de ejecución de la apoptosis, con la destrucción completa de la célula. Las proteínas degradadas por las caspasas son muy variadas e incluyen proteínas estructurales y relacionadas con la transcripción y modificaciones posteriores de segmentos del ADN. Entre ellas se

encuentran las nucleasas citoplasmáticas, que degradan el material nuclear.

- Por el contrario, existe otra vía de activación del proceso apoptótico, la vía intrínseca. Ésta puede ser desencadenada por daño en el ADN o por estrés celular. En ésta cobra gran importancia la activación del gen supresor de tumores p53, que a continuación, activa proteínas pro-apoptóticas. Entre ellas, destacan los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) que contiene tanto miembros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L) como pro-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bik). Estas proteínas se encuentran fundamentalmente en la membrana externa mitocondrial, retículo endoplásmico y membrana nuclear⁸⁶. La expresión de los componentes pro-apoptóticos favorece la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial con la consiguiente liberación de proteínas activadoras de las caspasas, como el citocromo-C o Apaf-1. Una vez que el citocromo C se une a Apaf-1 y a la procaspasa-9, se forma un apoptosoma que posteriormente activa la caspasa-9. Comienza así la activación de la cascada de las caspasas que permiten la digestión de los objetivos esenciales que afectan a la viabilidad celular.

2.2.2.d. Teoría inmunogenética.

Junto a los datos descritos de proteólisis de la MEC y la pérdida de CML, la inflamación supone un punto fisiopatológico esencial en las teorías actuales de los AAA, comunes a otras formas de enfermedades inflamatorias crónicas⁸⁷. Ejemplos

de asociaciones de los AAA con la inflamación incluyen un aumento de la proteína C reactiva (PCR) o el infiltrado local inflamatorio en la aorta, especialmente por linfocitos y macrófagos. La respuesta inflamatoria puede explicar la degeneración aneurismática a través de diversos mecanismos. Así, las células inflamatorias, principales productoras de MMPs y citoquinas (IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral -TNF) favorecen la destrucción de la matriz extracelular^{88, 89} y la inducción de las vías de la apoptosis de las CML⁹⁰, principales regeneradoras de la MEC, como se ha explicado previamente.

Existen, además, hallazgos en los que se pone de manifiesto que la respuesta inmune celular también puede formar parte en la modulación de la patogénesis de los AAA. Como ya se ha comentado, los linfocitos CD4+ (helper) son prevalentes en los AAA, y las citocinas tipo Th-1 o pro-inflamatorias (IL-1 y TNF- α), que aumentan la expresión en los macrófagos de proteinasas que degradan la matriz, se encuentran en mayor cantidad en los aneurismas de aorta abdominal^{88, 89}. Sin embargo, también se ha observado que las citocinas Th-2 o anti-inflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10) también se encuentran aumentadas, sugiriendo que existen mecanismos reguladores celulares endógenos capaces de suprimir la destrucción celular⁹¹. Otros trabajos realizados en modelos animales indican un predominio de la respuesta inmune tipo Th-1 en la fase temprana de la formación del aneurisma con un incremento en la producción de citocinas Th-2 en fases más avanzadas de la enfermedad, que actuarían suprimiendo la inflamación⁹². Por tanto, en pacientes con AAA, el modo y amplitud de esta respuesta inmune celular podría jugar un papel importante en la variabilidad observada tanto en la velocidad como en la extensión de la progresión del aneurisma,

tanto entre distintos individuos como dentro de un mismo individuo en distintos momentos.

No obstante, se desconoce aún el desencadenante de esta reacción inflamatoria. Diversos estudios abogan por una susceptibilidad genética manifestada como enfermedad autoinmune, en los que se asocia la presencia de AAA con haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad humana ⁹³, al igual que se ha demostrado en otras enfermedades autoinmunes.

2.2.2.e. Papel del estrés oxidativo en los AAA.

Diversos estudios han asociado la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen los radicales libres de oxígeno y los peróxidos, y especies reactivas de nitrógeno (RNS) con enfermedades crónicas que incluyen la aterosclerosis y la hipertensión. Del mismo modo, considerando el entorno inflamatorio de los AAA, parece importante el papel que pueda desempeñar el estrés oxidativo en la patogenia de los AAA. La producción continuada durante el metabolismo celular normal y disminución de su destrucción o la producción incrementada asociada a una respuesta inflamatoria provoca un daño celular y tisular progresivo, denominado estrés oxidativo, como el objetivado en los AAA, secundario a disfunciones metabólicas y daño en macromoléculas biológicas.

Durante el metabolismo aerobio se generan pequeñas cantidades de ROS de forma constante, incluyendo radicales hidroxilo, aniones superóxido y peróxido de hidrógeno, en respuesta a estímulos internos y externos. Estas mínimas concentraciones de ROS son indispensables en muchos procesos relacionados con la

señalización intracelular (proliferación celular, apoptosis...), la inmunidad y la defensa contra los organismos. Todas las células mantienen un entorno reductor gracias a enzimas que sostienen este estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica.

Las fuentes de ROS incluyen componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, xantina oxidasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, hemooxigenasa, NADH/NADPH oxidasa y NO sintasa. No obstante, el desbalance entre la producción y destrucción de ROS no sólo depende de las fuentes de estos elementos sino también de los antioxidantes celulares y enzimas endógenas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa).

Se han identificado diversas fuentes de ROS en el tejido aneurismático, a través de reacciones mediadas por enzimas que incluyen el metabolismo lipídico (ciclooxigenasa) ^{94, 95} o la disregulación en la producción de NO endotelial ⁹⁶. No obstante, cabe destacar el papel de la NADPH oxidasa como principal fuente de ROS en los AAA. Además de las citoquinas producidas por los linfocitos, macrófagos y CML que aumentan la actividad de esta enzima, junto con el estrés mecánico parietal, se han identificado factores de crecimiento (angiotensina-II), mediadores lipídicos (leucotrienos), o el LDL oxidado como promotores de la actividad enzimática de la NADPH oxidasa.

2.3. METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR

Se define como metabolismo energético al conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren en una célula con tres objetivos: obtención de energía, síntesis de macro y biomoléculas funcionales y estructurales a partir de precursores simples y transporte activo de moléculas e iones. Estas reacciones constituyen complejos procesos interrelacionados y pueden consistir en dos tipos:

- a) Reacciones catabólicas: aquéllas en las que se obtiene energía a partir de la degradación de sustancias complejas.
- b) Reacciones anabólicas: aquéllas que requieren energía para obtener moléculas orgánicas complejas.

La principal fuente de energía celular se obtiene a partir de la glucólisis, ruta metabólica inicial del catabolismo de los hidratos de carbono.

2.3.1. Glucólisis. Formación de piruvato

Esta vía universal supone una ruta de 10 pasos que convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, con generación de dos moléculas de ATP (adenosin trifosfato) por cada piruvato.

El ATP está formado por una base nitrogenada (adenina), unida al carbono 1 de la pentosa ribosa con tres grupos fosfato en el carbono 3. Posee dos enlaces anhídrido de alta energía y la hidrólisis de uno de ellos libera 31 KJ/mol, en una

reacción muy exergónica, es decir, proclive a la hidrólisis. Se considera, por tanto, al ATP como la principal moneda energética en el metabolismo celular.

En los organismos aerobios la glucólisis supone el primer paso, anaerobio, de la oxidación completa de la glucosa en CO_2 y agua y tiene lugar en el citosol celular. Estas diez reacciones se agrupan en dos fases distintas, esquematizadas en la Figura 2.4.

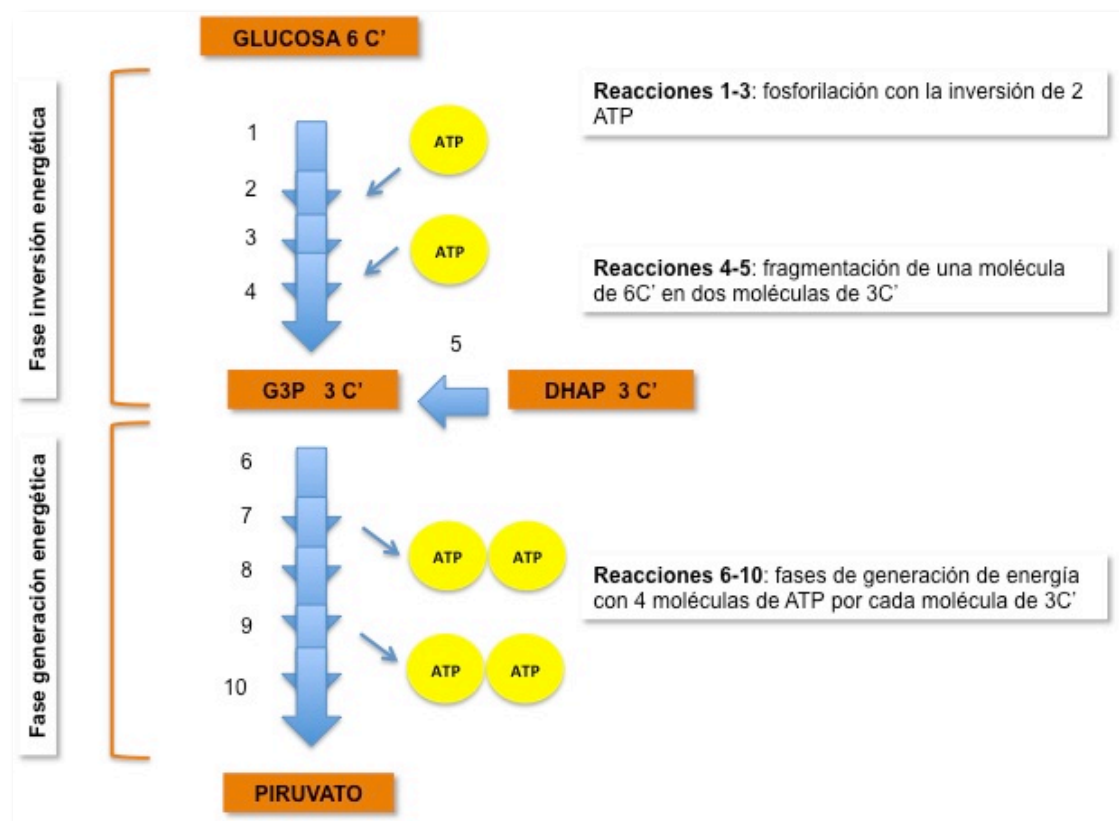


Figura 2.4: Esquema de las reacciones incluidas en la glucólisis. C': carbono. G3P: gliceraldehído-3-fosfato. DHAP: dihidroxiacetona fosfato. ATP: adenosin trifosfato.

1. Reacciones 1-5: Fase de inversión energética

- **Reacción 1.** Fosforilación de la glucosa. El primer paso de la glucólisis consiste en la activación de la glucosa mediante la transferencia de un grupo fosfato del ATP por la enzima hexoquinasa. Como consecuencia se forma la glucosa-6-fosfato (G6P).

- Reacción 2. Isomerización de la glucosa-6-fosfato. En esta reacción, catalizada por la fosfoglucoisomerasa, la G6P se isomeriza a fructosa-6-fosfato (F6P) a través de un intermediario enediol.
- Reacción 3. Fosforilación de la fructosa-6-fosfato. En esta reacción se lleva a cabo la segunda fosforilación dependiente de ATP mediante la fosfofructoquinasa (PFK) para producir un derivado de hexosa fosforilado en los carbonos 1 y 6 (fructosa 1,6-bifosfato). Esta reacción es lo suficientemente exergónica como para ser prácticamente irreversible *in vivo*, constituyendo el primer lugar de regulación del flujo de carbono a través de la glucolisis.
- Reacción 4. Fragmentación de la fructosa 1,6-bifosfato. Una enzima clave en la vía glucolítica es la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa (denominada habitualmente aldolasa) que escinde la fructosa 1,6-bifosfato en dos triosas fosfato: la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P).
- Reacción 5. Isomerización de la dihidroxiacetona-fosfato. La función del enzima catalizadora en esta reacción, la triosafosfato isomerasa (TPI), es la de convertir la DHAP en otro G3P, sustrato de la reacción siguiente. La TPI es un enzima fundamental dado que su acción permite utilizar los 6 átomos de carbono de la glucosa.

Cabe destacar la importancia de estas dos últimas enzimas en la regulación de este conjunto de reacciones, dado que son las responsables del mantenimiento o

modificación de la velocidad que conduce esta ruta metabólica.

2. Reacciones 6-10: Fase de generación de energía

- Reacción 6. Oxidación y fosforilación del gliceraldehído-3-fosfato. Esta reacción es catalizada por el enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, oxidando el G3P mediante la utilización de NAD^+ para añadir un ion fosfato a la molécula y obteniendo el 1,3-bifosfoglicerato, intermediario de energía elevada, y dos equivalentes reductores NADH.
- Reacción 7. Primera fosforilación a nivel de sustrato: cesión de un grupo fosfato del 1,3-bifosfoglicerato al ADP. En este paso, la enzima fosfogliceratoquinasa transfiere el grupo fosfato del 1,3-bifosfoglicerato a una molécula de ADP, generando así la primera molécula de ATP de la vía y el 3-fosfoglicerato.
- Reacción 8. Isomerización del 3-fosfoglicerato. La enzima fosfogliceratomutasa isomeriza el 3-fosfoglicerato procedente de la reacción anterior, dando el 2-fosfoglicerato.
- Reacción 9. Deshidratación del 2-fosfoglicerato. En este paso, catalizado por la enolasa, se produce una pérdida de una molécula de agua del 2-fosfoglicerato para dar lugar al fosfoenolpiruvato (PEP), compuesto de gran energía.
- Reacción 10. Segunda fosforilación a nivel de sustrato: cesión de un grupo fosfato al ADP. La última reacción de la glucólisis es catalizada por la piruvato quinasa y da

lugar al piruvato por la cesión de un grupo fosfato del PEP al ADP.

2.3.2. Destinos metabólicos del piruvato

Como se mencionaba previamente, la glucólisis supone la fase inicial de la oxidación de la glucosa. El piruvato obtenido es un compuesto orgánico clave en el metabolismo energético dado que constituye el punto central de ramificación metabólica. Su destino depende fundamentalmente del estado de oxidación de la célula, relacionado con la reacción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) de la glucólisis en la que se obtiene NADH y que debe reoxidarse a NAD^+ para continuar la glucólisis a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial donde los electrones se transfieren finalmente al oxígeno. Recordemos que la oxidación supone la pérdida de electrones de un sustrato (donador) que se transfieren a un aceptor electrónico que queda reducido. En los átomos de carbono esta oxidación puede derivar de la pérdida de hidrógeno o a través de su combinación con el oxígeno.

En los organismos aerobios, el principal destino del piruvato es su metabolismo oxidativo (respiración), mediante la transformación del piruvato en acetil-coenzimaA (acetil-CoA) y su posterior oxidación a través del ciclo del ácido cítrico o tricarboxílico. En caso de existir condiciones aerobias insuficientes para oxidar el NADH formado en la glucólisis, el piruvato debe reducirse a lactato (fermentación) (Figura 2.5).

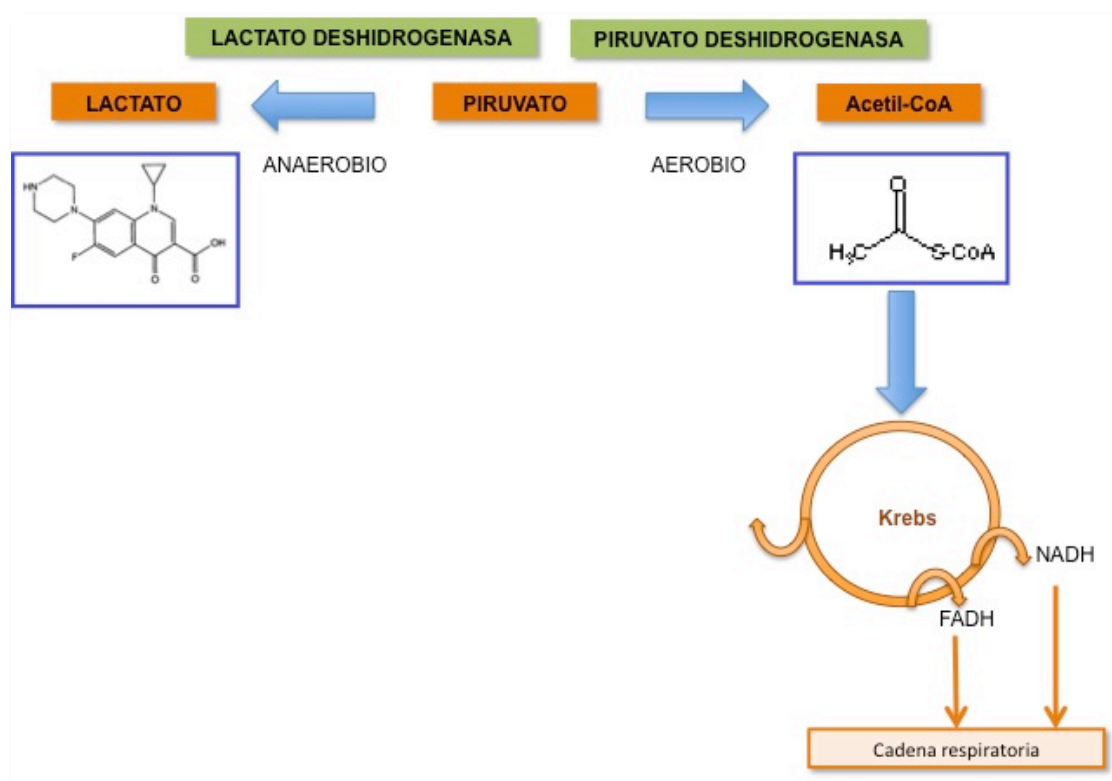


Figura 2.5: Esquema de las rutas metabólicas a partir del piruvato.

2.3.2.a. Vía metabólica aerobia. Metabolismo oxidativo: respiración.

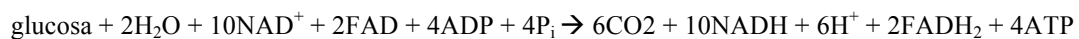
La oxidación metabólica constituye un proceso de tres etapas que tienen lugar en la mitocondria. Esta organela está constituida por una membrana externa, una membrana interna, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial situada dentro de la membrana interna. La membrana interna se pliega a su vez generando las crestas proyectadas hacia el interior de la mitocondria. Dado que las proteínas de la cadena respiratoria se encuentran embebidas en la membrana interna, la densidad de las crestas está relacionada con la actividad respiratoria de la célula.

•Transformación del piruvato en acetil-coA. Esta reacción supone una descarboxilación oxidativa, que, *in vivo*, es básicamente irreversible. La reacción global comporta la generación de un transportador electrónico reducido (NADH), la

descarboxilación del piruvato y la activación metabólica de los dos carbonos restantes del piruvato, generando un fragmento activado de dos carbonos (grupo acetilo de la acetil-CoA). Está catalizada por un complejo de tres enzimas, denominado complejo piruvato deshidrogenasa, y cinco coenzimas que incluyen el NAD^+ y la coenzima A.

- Ciclo del ácido cítrico / tricarboxílico / Ciclo de Krebs. Esta segunda etapa constituye la oxidación de los dos carbonos de la acetil-CoA. En resumen, estos carbonos se transfieren a un ácido orgánico de cuatro carbonos (oxalacetato) para originar un ácido tricarboxílico de seis carbonos (citrato). Éste entra en una serie de siete reacciones en las que se liberan dos carbonos en forma de CO_2 y los cuatro carbonos restantes se regeneran en forma de oxalacetato, que inicia de nuevo el proceso, de forma cíclica. Así, al igual que en la glucólisis, cabe diferenciar dos fases en este ciclo: 1) Reacciones 1-4: oxidación de dos carbonos a CO_2 y 2) Reacciones 5-8: regeneración del oxalacetato.

- Transporte electrónico y fosforilación oxidativa. El balance global de la glucólisis, con producción de dos moléculas de piruvato, junto con la oxidación de cada una de ellas en el ciclo de Krebs puede resumirse en la siguiente ecuación:



Por tanto, la producción de ATP por mol de glucosa metabolizada no aumenta significativamente respecto a la glucólisis aislada, siendo la mayor parte del ATP generado en un tejido aerobio a partir de la reoxidación de los transportadores electrónicos reducidos (NADH y FADH_2) por las enzimas de la cadena respiratoria y

posterior fosforilación oxidativa, con un balance final de 38 moles de ATP tras la oxidación completa de 1 mol de glucosa.

Las proteínas de la cadena respiratoria localizadas en la membrana interna son proteínas transportadoras, entre las que destacan los citocromos, ensamblados en 5 complejos multiproteicos (I, II, III, IV y V). El complejo V, también denominado ATP sintasa-complejo F_0 - F_1 , supone el paso final con la síntesis de ATP a partir del ADP y un grupo fosfato y de la energía suministrada por un flujo de protones (H^+) generados por los complejos de la cadena respiratoria creando un gradiente energético que impulsa el complejo V a la formación de ATP. El nudo F_1 se proyecta a la matriz mitocondrial y contiene tres dímeros $\alpha\beta$, conectados al tallo del complejo F_0 , con tres subunidades proteicas (a, b y c). La mayor parte del sitio catalítico reside en la cadena β ⁹⁷ con una tasa de transporte electrónico limitada por la disponibilidad de ADP para su conversión en ATP como principal mecanismo regulador.

2.3.2.b. Vía metabólica anaerobia. Metabolismo del lactato.

La enzima que cataliza la reducción de piruvato en lactato es la lactato deshidrogenasa, que utiliza una molécula de NADH. Esta reacción supone una fermentación, definida como ruta metabólica productora de energía que no comporta un cambio neto del estado de oxidación. En los vertebrados, algunos tejidos obtienen la mayor parte de su energía a partir del metabolismo anaerobio, tales como los eritrocitos o el músculo esquelético cuando la necesidad de generar energía supera la capacidad de oxidar el piruvato producido en la glucólisis. Tradicionalmente se pensaba que la formación de lactato en el músculo esquelético era consecuencia del

metabolismo anaerobio, pero estudios metabólicos como el análisis por RMN con ^{31}P sugieren que el lactato es un producto intermediario y no una vía metabólica muerta, a partir de los datos que sugieren que, incluso en un tejido muscular completamente oxigenado, un 50% de la glucosa metabolizada se convierte en lactato, pudiendo constituir una forma de coordinar las rutas de almacenamiento y generación de energía en los tejidos ⁹⁸.

2.3.3. Vía de las pentosas fosfato

Supone una vía alternativa que tiene lugar en el citosol celular y tiene dos funciones principales: 1) proporciona NADPH para la biosíntesis reductora y 2) proporciona ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Se relaciona con el catabolismo de la glucosa por oxidar este compuesto a CO_2 y agua. En resumen, esta vía tiene dos fases:

- Fase oxidativa: a través de tres reacciones se produce la oxidación de la glucosa-6-fosfato en ribulosa-5-fosfato y CO_2 con la generación de 2 moles de NADPH. En esta fase intervienen la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lactonasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa.
- Fase no oxidativa: en esta fase parte de la ribulosa-5-fosfato se convierte en ribosa-5-fosfato por la fosfopentosa isomerasa. Este compuesto puede utilizarse en la síntesis de nucleótidos o bien continuar la vía de las pentosas fosfato en la que se encadenan varias transformaciones con el siguiente resultado: la obtención dos azúcares

fosfato de 6 carbonos y un azúcar fosfato de tres carbonos. Las hexosas fosfato pueden entrar de nuevo en la ruta de las pentosas o bien ser catabolizadas mediante la glucolisis. La triosa fosfato (que es el gliceraldehído-3-fosfato) constituye un intermediario glucolítico tal y como veíamos con anterioridad.

No obstante, esta vía no tiene como principal función la generación de energía. El destino final de los azúcares fosfato depende de las necesidades metabólicas de la célula en la que se está produciendo la vía, por lo que la fase no oxidativa puede verse incrementada o disminuida en función de los sustratos requeridos en un determinado momento.

2.3.4. Fuente de glucosa celular. Transportadores GLUT.

La principal fuente de energía celular procede de la oxidación completa de la glucosa, como se ha referido previamente, y para el transporte de la misma a través de la membrana celular se requiere de unos transportadores proteicos dada la polaridad de dicha molécula. Existen dos formas de introducir glucosa a nivel intracelular:

1. Transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT, del inglés *sodium-glucose transporters*), de expresión predominante en el epitelio intestinal y a nivel renal.
2. Transportadores GLUT (del inglés *glucose transporter*) pertenecientes a la familia SLC2 (del inglés *solute carrier family 2*). Estas

proteínas constituyen proteínas integrales de membrana y facilitan el transporte de la molécula de glucosa mediante un transporte pasivo o difusión facilitada, sin gasto energético de ATP. Hasta el momento, se han identificado 14 miembros de esta familia de GLUT (GLUT-1 hasta GLUT-14) divididos en tres clases (I, II y III) en función de su estructura y funcionalidad. Todas estas proteínas comparten hasta un 50% de su secuencia de aminoácidos, con una estructura similar de al menos 12 dominios hidrofóbicos transmembrana en estructura de α -hélice junto con un loop extracelular (extremo N-terminal) y un loop hidrofílico intracelular (COOH-terminal). Los diversos miembros de esta familia difieren en la longitud y secuencia aminoacídica del loop extracelular así como en el dominio COOH-terminal intracelular, confiriendo una funcionalidad específica para cada uno, con características cinéticas propias⁹⁹. Asimismo, la glicosilación en el extremo N-terminal a nivel del loop 1 en las clases I y II y a nivel del loop 9 en la clase III de estos transportadores supone un requerimiento para mantener la elevada afinidad por el sustrato (glucosa)¹⁰⁰.

Existen diversos estudios que localizan cada isoforma de la familia en un determinado tejido. Cabe destacar el papel de GLUT-3, clonado por Kayano⁹⁹ perteneciente a la clase I junto con GLUT-1, 2 y 4, y el analizado en la presente tesis, conocido tradicionalmente como transportador neuronal. Se trata de un transportador de elevada afinidad por la glucosa y, a pesar de su denominación inicial, se ha estudiado la presencia de GLUT-3 en otros tejidos con

requerimientos de glucosa específicos como las células espermáticas, embriones, células blancas sanguíneas y en un amplio abanico de líneas celulares carcinomatosas¹⁰⁰. Algo particularmente significativo acerca de la presencia de GLUT-3 en linfocitos, macrófagos, neutrófilos y plaquetas, es su disposición intracelular con la capacidad de reclutamiento hacia la membrana plasmática tras la activación celular en respuesta a una necesidad incrementada de energía.

2.4. PROTEÓMICA

El objetivo principal de la proteómica es la identificación y cuantificación de cada proteína presente en una muestra biológica a gran escala en lo referente a su estructura y función, constituyendo uno de los más potentes métodos de separación de proteínas disponible en la actualidad. Hasta su desarrollo, la identificación y monitorización de los cambios en la expresión de varias proteínas relacionadas con un proceso metabólico a partir de una muestra común en un mismo momento era difícil de realizar.

Se define como proteoma de un organismo al conjunto de proteínas complementarias del genoma funcional. A diferencia del genoma, el proteoma es altamente dinámico, varía acorde al tipo de célula y su estado funcional pudiendo reflejar cambios inmediatos y característicos en respuesta a determinadas enfermedades o estímulos externos. Este conjunto de proteínas presentes en un fluido corporal, un tejido o un organismo es un subconjunto de todos los posibles productos

del genoma en un momento dado, por lo que el proteoma no puede predecirse directamente a partir de la información estática del genoma. Este factor de complejidad adicional refleja el hecho de que una proteína pueda existir en múltiples formas según las modificaciones procedentes, principalmente, de dos fuentes: el recorte o *splicing* alternativo en la transcripción del ARN a partir del ADN y las modificaciones postraduccionales que modifican la estructura proteica, su localización o función en los diferentes contextos fisiopatológicos (Figura 2.6).

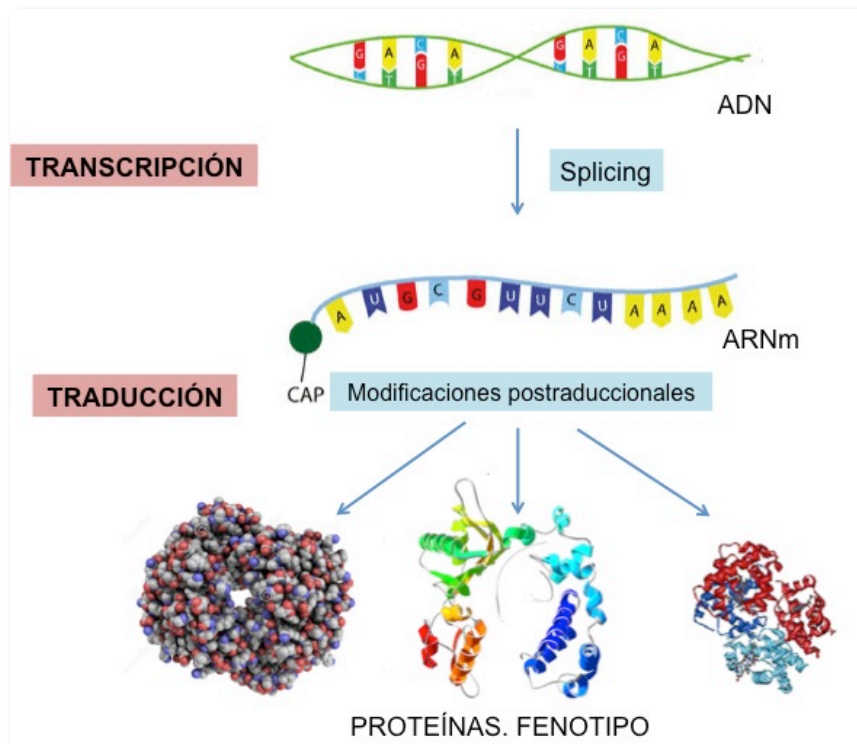


Figura 2.6. Visión esquemática de la secuencia de transcripción y traducción de la información genómica al resultado proteico.

Se estima que el genoma humano contiene entre 20.000 y 25.000 genes codificantes de proteínas, número muy inferior a las estimaciones iniciales. Sin embargo, las células humanas recurren al *splicing* y a las modificaciones postraduccionales para producir proteínas distintas a partir de un único gen^{101, 102}, también denominadas fenotipos (Figura 2.6), que, a su vez, proporcionan una gran

diversidad y diferente susceptibilidad a determinadas enfermedades. Dado que las proteínas poseen una función estructural, enzimática, inmunológica, contráctil, homeostática y transductora de señales, son indispensables para todas las funciones biológicas. Por ello, el estudio y comparación del proteoma en diversas situaciones puede identificar proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlacione con un estado fisiológico o patológico concreto, obteniendo proteínas útiles en el diagnóstico o pronóstico de las enfermedades a estudio. Estas proteínas se denominan, de forma genérica, biomarcadores.

Los elementos técnicos de la proteómica se basan, fundamentalmente, en la electroforesis bidimensional (2-DE) previa a la espectrometría de masas (MS)¹⁰³. No obstante, combina otra multitud de técnicas que incluye análisis de imagen, secuenciación de aminoácidos y bioinformática¹⁰⁴.

A pesar de no ser hasta 1996 cuando se utilizó el término “proteómica” para describir la caracterización del conjunto de todas las proteínas presentes en una célula, fluido o tejido en un momento dado¹⁰⁵, en la década de los 70 la electroforesis en dos dimensiones se utilizaba como una herramienta para la separación y cuantificación de proteínas¹⁰⁶. A finales de los años 80, a raíz de la aparición de las membranas PVDF (*polyvinylidene difluoride*, fluoruro de polivinilideno)¹⁰⁷ y la creación de la primera base de datos para geles bidimensionales, esta tecnología comenzó a ganar popularidad, con una alta resolución y reproducibilidad.

El auge de la proteómica, sin embargo, comenzó a partir de los años 90, coincidiendo con el comienzo de la era de la espectrometría de masas (técnica de

apoyo fundamental para el estudio proteómico), permitiendo realizar estudios cada vez más exhaustivos convirtiéndose en un instrumento esencial en el estudio de diferentes patologías^{108, 109} al contribuir al entendimiento de la función de los genes

110

Con todo ello se obtiene una información cualitativa y cuantitativa pudiendo determinar la existencia o no de una proteína comparando los resultados en la muestra basal y tras un estímulo o condición patológica.

Otra ventaja de esta técnica es la capacidad de detectar las distintas isoformas de una misma proteína (derivadas de las distintas modificaciones bioquímicas postraduccionales), circunstancia que no es posible utilizando el resto de técnicas de análisis e identificación proteica. Este punto es de gran importancia, ya que es posible que las isoformas de una determinada proteína tengan propiedades funcionales distintas a las de la proteína original.

Más allá de la catalogación de proteínas, la proteómica pretende establecer su estructura, actividad biológica, modo de acción, localización celular, modificaciones postraduccionales e interacción con otras proteínas o moléculas. De esta manera, la comprensión de las situaciones fisiológicas nos permiten acercarnos al conocimiento de las condiciones patológicas.

2.4.1. Aplicación de la proteómica en los AAA.

Una de las principales aplicaciones de la proteómica en el área de la salud es

la identificación de espectros proteicos diferenciales entre muestras de pacientes control (sanos) y pacientes con un determinado estado patológico para la obtención de posibles marcadores que, tras su validación, puedan utilizarse como moléculas diagnósticas o pronósticas de las diferentes enfermedades tras el estudio masivo de las proteínas contenidas en una muestra. Así, se han identificado marcadores séricos y urinarios con resultados prometedores en condiciones como vasculitis, enfermedades renales, tumores y aterosclerosis ^{111, 112, 113}.

En relación a los AAA, ante una patología que cursa habitualmente de forma asintomática, en la actualidad, los programas de screening se basan únicamente en técnicas de imagen (ecografía abdominal). Diversos estudios, por tanto, se han basado en la tecnología de la proteómica con el objetivo de buscar marcadores no sólo de presencia o formación de AAA sino favorecedores de su crecimiento y progresión ¹¹⁴ aunque por el momento ninguno ha sido validado en la práctica clínica.

Así el grupo de Moxon *et al* ¹¹⁵ identificó como marcadores potenciales la apolipoproteína C1 (ApoC1) y la MMP-9 en un modelo murino modificado genéticamente (ApoE^{-/-}) para la creación de AAA en sus portadores, según el procedimiento descrito por Daugherty ¹¹⁶. Asimismo, las concentraciones plasmáticas de estos dos marcadores también se correlacionaban con el diámetro aneurismático. Sin embargo, en este estudio no se consideraba la rotura aneurismática, por lo que dichos marcadores se planteaban únicamente para la detección del AAA. Trabajos posteriores han identificado la interleukina-6 (IL-6) ¹¹⁷ y otras proteínas de la matriz extracelular como marcadores de rápida progresión o rotura. Sin embargo, su baja sensibilidad y especificidad hacen de las mismas un marcador poco fiable como única

herramienta del diagnóstico y pronóstico de los AAA ¹¹⁸. El análisis proteómico, realizado por primera vez a gran escala en extractos de pared aórtica humana (no cultivos celulares) por el grupo de Molacek ¹¹⁹ demostró diferencias en el proteoma de los AAA frente a aortas de individuos sin patología aneurismática o con presencia de aterosclerosis, siendo éste más rico y diferencial respecto a las muestras control. Se obtuvieron más de 100 proteínas diferenciales, siendo identificadas 25, la mayoría probablemente involucradas en la patogénesis de los AAA.

A pesar de una todavía baja aplicabilidad clínica como marcadores biológicos en los AAA, la información adquirida de estos estudios no deja de ser muy útil en el conocimiento de la patogenia de esta entidad así como la posibilidad de incluir estos marcadores en escalas conjuntas con otros factores de riesgo establecidos ¹²⁰.

3. HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

La etiopatogenia de los AAA sigue siendo motivo de discusión en la actualidad, con creciente interés en el conocimiento de los mecanismos específicos que llevan no sólo a su aparición sino también al crecimiento de los mismos. El objetivo final es el de desarrollar futuras dianas terapéuticas para esta entidad para la que, hoy día, solamente existe una solución quirúrgica.

Los mecanismos principalmente estudiados han sido la inflamación y la destrucción estructural de la capa media aórtica así como la respuesta protagonizada por la adventicia. Todos estos procesos suponen una serie compleja de reacciones que incluyen señalización, transporte de biomoléculas, regulación de la expresión genética, etc... No obstante, existe en la literatura escasas referencias al metabolismo energético celular que permite la consecución de todas estas reacciones.

Así, el estudio del metabolismo energético del tejido aórtico aneurismático podría suponer una nueva línea de investigación que permita dilucidar los numerosos y complejos procesos implicados en la aparición y progresión de la enfermedad aneurismática, acompañada de una disfunción vascular, de igual forma que se ha visto en otras enfermedades vasculares como la aterosclerosis.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Los objetivos principales de la presente tesis son:

1. Analizar si existen variaciones en la expresión proteica de las principales enzimas que regulan la glucolisis, en el aneurisma de aorta abdominal en relación a la pared aórtica sana.
2. Evaluar si existen diferencias en la actividad enzimática de proteínas relacionadas con la glucolisis el tejido aórtico aneurismático y la pared aórtica sana.
3. Evaluar el metabolismo anaeróbico de la glucosa en el aneurisma de aorta abdominal respecto a la pared de aorta sana.
4. Analizar si uno de los principales transportadores de la glucosa en la pared aórtica (GLUT-3) sufre modificaciones en presencia de enfermedad aneurismática.
5. Determinar si la expresión de la piruvato deshidrogenasa, enzima clave para la continuación del metabolismo de la glucosa hacia el ciclo de Krebs al formar Acetil-CoA, es diferente entre la pared del aneurisma aórtico y la pared sana.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente tesis parte de la obtención de muestras aórticas de pacientes portadores de aneurisma de aorta abdominal (grupo AAA) y donantes (controles) para su posterior manipulación y análisis proteómico *in vitro*. El estudio y protocolo del estudio fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Clínico San Carlos, Madrid. Todas las muestras fueron obtenidas tras la firma del consentimiento informado de los pacientes, y en el caso de los donantes de órganos, tras la aprobación de la familia.

5.1. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS AÓRTICAS

Las muestras de pared aórtica del grupo AAA fueron obtenidas durante la reparación quirúrgica de un aneurisma de aorta abdominal (resección del aneurisma e interposición de una prótesis vascular), procedente de la región más dilatada de la aorta infrarenal (>5cm). Los pacientes con collagenopatías tipo Síndrome de Marfan, afectación aneurismática con extensión toracoabdominal, aneurismas inflamatorios, sintomáticos o rotos, enfermedades inflamatorias sistémicas, antecedentes de enfermedad oncológica o que hubieran sido intervenidos quirúrgicamente en los 6 meses previos fueron excluidos. Todos los pacientes incluidos en este grupo fueron evaluados mediante la realización de una tomografía axial computarizada (TAC) para descartar la presencia de una dilatación a nivel de la aorta torácica y para evaluar las

características anatómicas, incluyendo el diámetro máximo, de la aorta abdominal de forma prequirúrgica.

Las muestras aórticas del grupo control (muestras de pared aórtica abdominal no aneurismática) fueron obtenidas a partir de donantes de órganos con lesión cerebral secundaria a un traumatismo encefálico grave. Los injertos del grupo control se obtenían durante el explante del bloque renal, que incluye el riñón y su pedículo, recogiendo una muestra aórtica a nivel de la arteria renal. El diámetro aórtico fue determinado antes de la extracción utilizando un calibre quirúrgico.

Las muestras aórticas, tanto del grupo AAA como control, fueron inmediatamente lavadas de sangre, con separación de la grasa y tejidos adyacentes tras su extracción, lavadas con una solución salina isotónica, y congeladas a -80°C en nitrógeno líquido hasta la realización de los análisis posteriores.

5.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS: ABORDAJE PROTEÓMICO

Con el objetivo de determinar diferencias en el proteoma relacionado con el metabolismo energético de la pared vascular aórtica en pacientes con AAA y el grupo control, se recurrió a la proteómica, tecnología que integra un conjunto de técnicas que permiten analizar a gran escala las proteínas de una muestra, tal y como se explica en el apartado **2.4 PROTEÓMICA**.

5.5.1 Fundamentos de la técnica

La Figura 5.1 esquematiza los pasos básicos en el análisis proteómico de una muestra biológica.

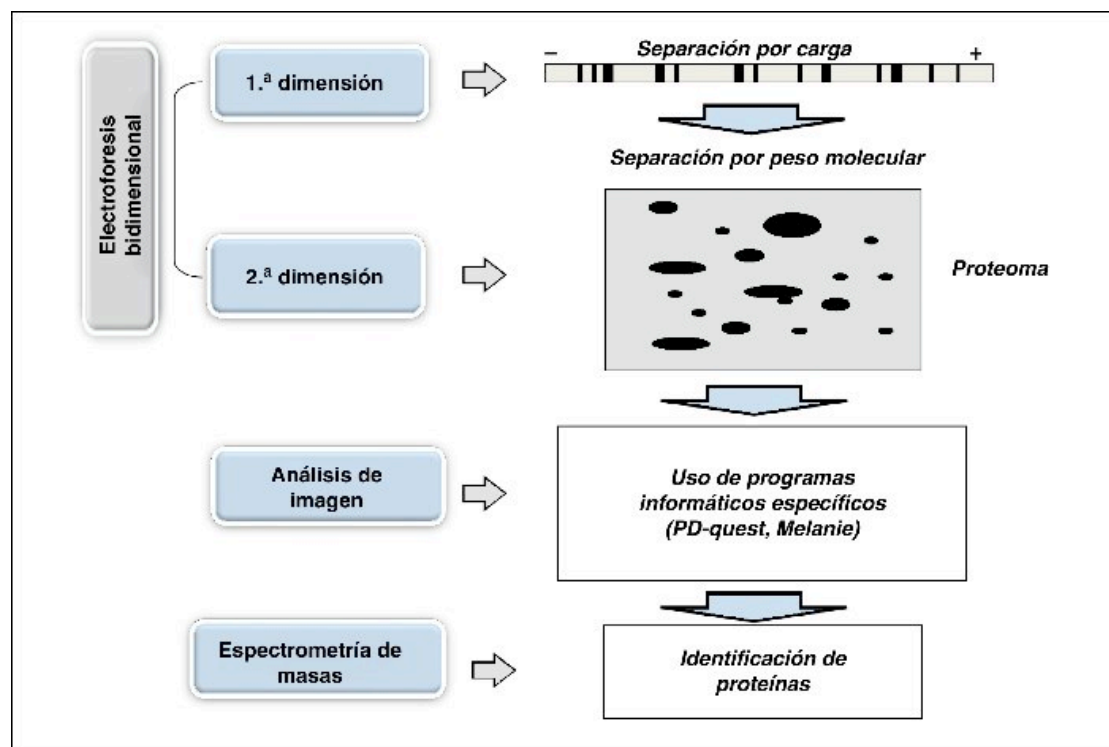


Figura 5.1: Esquema del análisis proteómico de una muestra biológica.

5.2.2 Electroforesis bidimensional (2-DE)

Supone el primer paso del estudio proteómico y es la base del desarrollo de los mapas de expresión proteica. Somete a las proteínas de una muestra (extractos celulares, tejidos, órganos o fluidos) a un proceso de doble electroforesis, permitiendo separarlas en dos dimensiones, definidas por dos de las características más representativas de una proteína: su punto isoeléctrico (pH al cual la carga neta de la proteína es 0) y su peso molecular. Dado que éstas son características únicas de cada

proteína, tras la 2-DE se obtiene un mapa de expresión proteica, de forma que cada proteína puede ser identificada según un sistema de coordenadas con dos ejes: punto isoelectrico y peso molecular.

Las coordenadas son únicas para cada proteína suponiendo un documento de identidad de la misma ¹²¹. Las modificaciones post-traduccionales de las proteínas son detectables con esta técnica, ya que dichas modificaciones confieren a las proteínas un cambio tanto de carga como de peso molecular, y por lo tanto, apareciendo en el gel de electroforesis en un lugar diferente de su posición habitual.

Habitualmente el orden de separación de proteínas es, primero por punto isoelectrico y posteriormente por peso molecular, tanto por razones económicas (la segunda separación es preferible que sea la más barata) como por motivos técnicos, dado que los geles utilizados para la separación de proteínas por peso molecular se tiñen más fácilmente que los geles isoelectricos ¹²². Sin embargo, se han publicado trabajos en los que el orden de separación es inverso ^{123, 124}.

5.2.2.a. Material utilizado

- Homogeneizador *Ultra-Turrax*[®] T8 (IKA[®]-Werke).
- Tampón de rehidratación.
- *Kit Pierce*[®] BCA Protein Assay.
- Geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (*Bio-Rad ReadyStrip*[™]).
- Sistema PROTEAN[®] IEF cell (*Bio-Rad Laboratories, Cal, USA*).

- Geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) al 10%.
- Sistema PROTEAN[®] II XL (*Bio-Rad Laboratories, Cal, USA*).
- *Fixative Enhance Concentrate* (*Bio-Rad Laboratories, Cal, USA*).
- *Kit Silver Stain Plus* (*Bio-Rad Laboratories, Cal, USA*).
- Escáner UMAX POWERLOOK III.
- Software *ScanMagic V 4.5*.
- Programa *Quantity One 4.2.3* (*Bio-Rad Laboratories, Cal, USA*).

5.2.2.b. Preparación de las muestras

Antes de proceder a la separación electroforética se deben solubilizar todas las proteínas de una muestra, sin modificaciones añadidas y eliminando otros componentes biológicos que puedan interferir en la separación. Especial cuidado ha de tenerse para no modificar la carga de las proteínas, por lo que las sustancias utilizadas no deben estar cargadas ¹²⁵.

Para el análisis, las muestras aórticas fueron aisladas y homogeneizadas con el homogeneizador Ultra-Turrax[®]T8 (IKA[®]-Werke). Éste es un instrumento de mano con una potencia de hasta 100 watios y unas velocidades de 5.000 a 25.000 revoluciones por minuto. Gracias al amplio rango de velocidades y a que el elemento dispersor tiene un diámetro de 5-8 mm, incluso pequeñas cantidades se procesan y dispersan rápidamente.

Se utilizó una solución tampón (tampón de rehidratación/ *rehydration buffer*) para la homogeneización con un agente desnaturalizante (urea), detergente (CHAPS y anfolitos) y un agente reductor (ditiotreitól) en las concentraciones que se exponen a continuación:

- Urea.....8 mol/l
- CHAPS w/v.....2%
- Ditiotreitól.....40 mmol/l
- Anfolitos Bio-LyteTH (*Bio-Rad Laboratories, USA*).....0.2%
- Azul de bromofenol w/v.....0.01%

Posteriormente, los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su análisis.

5.2.2.c. Primera dimensión

En esta fase se utilizan tiras de gel de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado (IPG, *Isoelectric Phocusing Gradient*), introducido por primera vez por Bjellqvist ¹²⁶. Al aplicar una corriente eléctrica, las proteínas presentes en la muestra pinchada, migran a lo largo de la tira IPG hasta que alcanzan una carga neta 0 y se detienen.

Respecto al campo eléctrico a utilizar en esta separación, y dado que la carga de las proteínas va disminuyendo constantemente hasta alcanzar el punto isoeléctrico, deben utilizarse campos eléctricos de gran fuerza para que en los últimos milímetros

las proteínas migren a una velocidad decente. Es muy común utilizar hasta 170 V/cm en el punto isoelectrico, mucho mayor que el empleado en la electroforesis SDS (15 V/cm).

La concentración de proteínas en las respectivas muestras fue determinada previamente mediante el *Kit Pierce® BCA Protein Assay*, formulación basada en el ácido bicinconínico (BCA). El principio del método del BCA, patentado por *Pierce Biotechnology* (Rockford, IL, USA), se basa en la formación de un complejo Cu^{2+} -proteína bajo condiciones alcalinas, seguido de la reducción del Cu^{2+} en Cu^{1+} ¹²⁷, similar al procedimiento de *Biuret*. La cantidad de reducción es proporcional a la proteína presente. El BCA forma un complejo azul púrpura con el Cu^{1+} por proteínas en medios alcalinos, de modo que permite monitorizar la reducción de Cu^{2+} por las proteínas a un máximo de absorbancia de 562 nm y de este modo, cuantificarlas. Se trata de un método colorimétrico en el que la estructura macromolecular de la proteína, el número de uniones peptídicas y la presencia de cuatro aminoácidos en particular -cisteína, cistina, triptófano y tirosina- han sido descritos como los responsables de la formación de color con BCA. La concentración de proteínas se determina en referencia, generalmente, a una proteína estándar común como la albúmina sérica bovina (BSA).

El ensayo BCA es más sensible y aplicable que los métodos de *Biuret* o de *Lowry* y con menor variabilidad que el método de *Bradford*. Entre otras características del ensayo BCA encontramos:

- Método colorimétrico, se lee a 562 nm.

- Compatible con la mayoría de los detergentes iónicos y no iónicos.
- Más rápido y fácil que el método de *Lowry*.
- Todos los reactantes son estables a temperatura ambiente durante 2 años.
- El rango de trabajo varía de 20 a 2000 µg/ml.
- El complejo de color es estable.
- Adaptable a microplatos.
- Menor variación de proteína a proteína que con los métodos de tinción.
- Es aplicable a un amplio rango de concentraciones de proteínas.

En el presente ensayo se siguieron los siguientes pasos para la cuantificación proteica:

1. Preparación de las diluciones estándar de BSA (albúmina de suero bovino), a partir de ampollas de BSA de 2.0 mg/ml. Se obtuvieron viales con concentraciones conocidas de BSA (µg/ml) para poder elaborar posteriormente la curva estándar, con la ecuación de su recta, a partir de la cual poder extrapolar las concentraciones de las muestras problema. Las concentraciones utilizadas de BSA fueron las siguientes: 0 (muestra blanco con agua), 10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 100, 200, 300, 400 µg/ml.
2. Preparación del reactivo de trabajo BCA: se empleó como reactivo el *kit Pierce® BCA Protein Assay*. Para determinar el volumen total de reactivo de trabajo se empleó la siguiente fórmula: $(x \text{ estándar} + x \text{ muestras problema}) \times (n^{\circ} \text{ duplicados}) \times (\text{volumen de reactivo de trabajo por muestras} = 200 \text{ µl}) = \text{volumen total}$. El reactivo de trabajo se preparó

mezclando 50 partes de reactivo A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, BCA y tartrato sódico en hidróxido sódico 0.1 M) con una parte de reactivo B (sulfato cúprico 4%).

3. Se pipetearon 25 μ l de cada vial del estándar y muestras problema por triplicado en pocillos.
4. Se añadieron 200 μ l de reactivo de trabajo a cada pocillo y se mezcló el platillo en un agitador durante 30 segundos.
5. Se tapó la placa y se incubó a 37°C durante 30 minutos.
6. Medida de absorbancia a 562 nm.
7. Se restó la absorbancia de la muestra blanco al resto de muestras.
8. Se calculó la ecuación de la recta a partir de las diluciones de BSA conocidas y la curva estándar: en el eje de ordenadas la medida de absorbancia; en el eje de abscisas, la concentración conocida de BSA. A partir de dicha ecuación, se extrapolaron los valores obtenidos en el resto de muestras problema.

Antes de realizar la primera dimensión, las muestras se sometieron a un lavado o *clean-up* para retirar excedentes y sales minerales usando un kit comercial siguiendo las recomendaciones del fabricante (*ReadyPrep 2-D Clean-up Kit, Bio-Rad Laboratories, USA*).

Finalmente, la cantidad total de proteína cargada para la realización de la primera dimensión de la 2-DE fueron muestras de 250 μ g, en tiras de geles de gradiente inmovilizado (IPG) con un pH de 3-10 (*Bio-Rad ReadyStrip™*).

La separación por foco isoelectrico se realizó con el sistema *Protean® IEF cell* (Bio-Rad Laboratories, USA) durante 72 horas a temperatura ambiente (20°C) ¹²⁸. El sistema consiste en una fuente de alimentación programable con una plataforma *Peltier* que mantiene la temperatura constante para asegurar la reproducibilidad. El rango de temperaturas varía de 10 a 25°C, lo que permite ampliar el rango de muestra de proteínas y condiciones. Dicho sistema permite acomodar hasta 24 tiras de 7 cm o 12 de 17 cm para realizar el foco isoelectrico pudiendo ser programado completamente para una rehidratación pasiva o activa (50 V). Las especificaciones técnicas del sistema se listan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® IEF cell (Bio-Rad Laboratories, USA).

RENDIMIENTO	
Voltaje	50-10000 V, incrementos de 10 V
Corriente	0-2.4 mA, incrementos de 1.0 µA
Potencia	0-24 W
PLATAFORMA <i>Peltier</i>	
Capacidad	24 tiras de 7 cm o 12 tiras de 11,17,18 ó 24 cm.
Temperatura de operación	10-25 °C
Dimensiones	28 x 30 x 14 cm

Los geles fueron rehidratados activamente a 50 V durante 60 horas seguido de rápidas subidas lineales de tensión y voltaje, limitados por una corriente máxima de 50 µA por gel.

5.2.2.d. Segunda dimensión

En la segunda dimensión, las proteínas de las tiras previas fueron separadas en geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% utilizando el sistema *Protean® II XL* (Bio-Rad Laboratories, USA). El SDS es un agente aniónico que aplica una carga negativa a cada proteína proporcional a su masa. Esta fase permite la identificación de nuevas proteínas y, además, la medición de la abundancia relativa entre diferentes muestras. La unidad *Protean® II XL* proporciona un gran área de separación de las proteínas lo que permite analizar muestras con mayor carga y, finalmente, obtener una mejor resolución respecto a los formatos de gel más pequeños. Las especificaciones técnicas se incluyen en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® II XL (Bio-Rad Laboratories, USA).

SISTEMA PROTEAN® II XL	
Número de geles	1-4
Tamaño del gel	18,3 x 20 cm (altura x longitud)
TAMAÑO DEL PLATO	
Interno	20 x 20 cm
Externo	20 x 22,3 cm
Longitud del espaciador	22,3 cm
Volumen superior del tampón	350 ml
Volumen inferior del tampón	1,2 L
TIEMPOS PARA EL SDS-PAGE	
Sin enfriamiento	5 h
Con enfriamiento	3,5 h

5.2.2.e. Tinción

Una vez separadas las proteínas, éstas deben visualizarse para cuantificarlas y analizarlas. Esto se consigue mediante la tinción de los geles. Se utilizó la tinción con nitrato de plata por su gran sensibilidad y durabilidad en el tiempo así como por su calidad de imagen ¹²⁹.

En el presente estudio los geles se fijaron en una solución con *Fixative Enhance Concentrate* (Bio-Rad Laboratories, USA), etanol y ácido acético en agua destilada durante 20 minutos. Posteriormente, se utilizó una solución de sensibilización compuesta por acetato sódico y tiosulfato sódico en agua destilada y se lavaron dos veces durante 10 minutos con agua destilada. A continuación los geles fueron teñidos con nitrato de plata utilizando el kit *Silver Stain Plus* (Bio-Rad Laboratories, USA) durante 25 minutos. Este kit es un sistema rápido y sencillo para detectar proteínas en los geles de poliacrilamida tras la electroforesis. Esta tinción con plata es muy sensible, pudiendo detectar incluso cantidades de proteína en rango de nanogramos. El kit *Silver Stain Plus* contiene los siguientes componentes:

- Concentrado potenciador del fijador.
- Solución de complejo de plata, que contiene NH_4NO_3 y AgNO_3 .
- Ácido tungstosilícico, compuesto por silicio y tungsteno ($\text{H}_4[\text{Si}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$) y que, a 20°C, es completamente soluble.
- Formaldehído.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) como agente acelerador de la tinción.
- Un bote de 1 L vacío.

Para la correcta tinción de los geles los contenedores se limpiaron con 50% de ácido nítrico después del detergente de laboratorio. Además, las superficies de los geles estuvieron completamente sumergidas y se evitaron temperaturas superiores a 25°C. Los geles teñidos se lavaron dos veces con agua destilada durante 5 minutos de forma consecutiva.

El siguiente paso fueron dos lavados con agua destilada de un minuto de duración cada uno para, seguidamente, aplicar la solución de revelado compuesta de carbonato sódico y formaldehído en agua destilada. Una vez que los geles alcanzaron el grado de tinción deseado se interrumpió el proceso mediante el empleo de una solución con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en agua destilada.

5.2.3 Adquisición y análisis de la imagen.

Una vez obtenido el mapa de expresión proteica queda analizar la imagen. Diversos programas informáticos facilitan el estudio de este tipo de imágenes (PD-QUEST, MELANIE,...) al realizar un análisis completo de los mapas y comparándolos con otros. Adicionalmente, existen mapas proteómicos integrados en bases de datos con acceso vía Internet. Una de las más conocidas y utilizadas es la suiza *Swiss-Prot* (<http://www.expasy.ch/>). El análisis cuantitativo se realiza mediante herramientas informáticas que facilitan la detección de variaciones en la expresión de proteínas, como por ejemplo el *software Quantity One* (Bio-Rad Laboratories, USA).

Los geles teñidos fueron escaneados utilizando un escáner UMAX POWERLOOK III operado por el software *ScanMagic V 4.5* para la digitalización de la imagen. En este caso el análisis cuantitativo de la imagen se realizó utilizando el programa *Quantity One 4.2.3* (*Bio-Rad Laboratories, USA*). Dicho *software* permite la adquisición, cuantificación y análisis de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles, mediante un análisis densitométrico. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas.

La identificación de cada punto se realizó por comparación con la base de datos *Swiss-Prot* (ExPASy). Con esto se obtuvo una idea de la proteína estudiada. Los puntos en los geles con diferencias significativas en los valores densitométricos entre los distintos grupos muestrales fueron posteriormente analizados con espectrometría de masas para la identificación de la proteína en cuestión.

5.2.4 Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas se ha desarrollado en las últimas décadas como un método de elevada sensibilidad en la identificación proteica¹⁰³. Se estima que mediante esta técnica pueden detectarse proteínas en geles en rango femtomolar (10^{-15} M/L), tolera el análisis de mezclas proteicas y permite realizar análisis múltiples, por lo que ha ido reemplazado a la secuenciación por el método EDMAN¹³⁰ como método de identificación proteica de elección.

La MS proporciona información sobre la masa peptídica y la secuencia de aminoácidos, separando los núcleos por su relación masa-carga. Esta información es utilizada para la identificación real de las proteínas mediante búsquedas en bases de datos que existen en la actualidad, tanto de proteínas como de nucleótidos.

Las mediciones en la MS se llevan a cabo en fase gaseosa, con los analitos ionizados. Las dos técnicas más utilizadas son ESI (*ElectroSpray Ionization*) y MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)^{131, 132}.

Por definición, un espectrómetro de masas consiste en una fuente ionizante, un analizador de masa: mide la ratio masa/ carga (m/z) de los analitos y un detector: registra el número de iones en cada valor de m/z . El analizador de masa es la tecnología fundamental del instrumento. Sus claves son la sensibilidad, la resolución y la capacidad de generar espectros a partir de fragmentos peptídicos (MS o en tándem MS/MS)¹³³. Existen cuatro tipos básicos de analizadores: la trampa de iones (*ion trap*), el tiempo de vuelo o TOF (*time of flight*), el cuádruplo y el FT-MS (*Fourier Transform ion cyclotron*). En general, MALDI se utiliza con analizadores tipo TOF. Así se obtiene la denominada huella peptídica que se explicará a continuación, tras el emparejamiento de la lista de las masas obtenidas en las muestras experimentales en comparación con las registradas en las bases de datos.

El proceso consta de cuatro pasos:

1. Aislamiento de las proteínas de la muestra.

2. Obtención de péptidos predecibles. Dado que la MS es menos sensible en el análisis de la proteína íntegra que en el estudio de sus péptidos, y que la masa de una proteína intacta por sí sola no es suficiente para su identificación, las proteínas de la muestra deben ser degradadas con tripsina, que rompe las proteínas en la zona carboxílica de los residuos de lisina y arginina (salvo que estén seguidos por una prolina).
3. Ionización de los péptidos tras tratamiento con láser. Esto les confiere una carga, y son separados según su ratio masa / carga (ratio m/z).
4. Obtención del espectro de masas de los péptidos. Por último, los péptidos son analizados por un detector que es capaz de medir la intensidad de cada fragmento. Se genera así una lista priorizada de éstos. En primer lugar se aísla un péptido determinado, se fragmenta por colisión con gas y se recopila un espectro o “huella peptídica”.

Los resultados obtenidos con el análisis espectrométrico son comparados con determinadas bases de datos (*MS-Fit*, *MASCOT*, *PROFOUND*, *Peptide Search...*), obteniendo la secuencia proteica completa y la identificación de la proteína estudiada.

5.2.4.a. Material utilizado

- Agua *Milli-Q*TM (*Merk Millipore*).
- Acetonitrilo (CH_3CN) al 100%.
- Sistema *SpeedVac*[®] (*Thermo Scientific*).
- Ditioneritritol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$).
- Bicarbonato amónico (NH_4HCO_3).

- Iodoacetamida (C_2H_4INO).
- Tripsina (*Promega*[®], *Madison, WI, USA*).
- Ácido trifluoroacético (TFA, CF_3COOH).
- Puntas mmol-18 *Zip* (*Millipore*).
- Matriz de α -ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*).
- Placa de MALDI (*Pro MS MALDI, Genomic Solutions*).
- 4700 *Proteomic Analyzer* (*Applied Biosystem, Old Connecticut Path, Framingham, MA, USA*).
- Calibradores estándar (*Applied Biosystem*).
- 4000 *Series Explorer Software* (*Applied Biosystems*).
- *GPS Explorer Software* (*Applied Biosystems*).

5.2.4.b. Metodología

Para la identificación de las proteínas de interés de nuestras muestras, los puntos se extrajeron manualmente de los geles teñidos tras la segunda dimensión utilizando un punzón para biopsias¹³⁴. La identificación de cada proteína se llevó a cabo extrayendo el mismo punto de interés de tres geles diferentes.

La tinción de plata fue solubilizada y eliminada y los puntos fueron lavados tres veces con agua del sistema *Milli-Q*[™] (*Merk Millipore*). Con este sistema se puede obtener agua ultrapura para este tipo de aplicaciones en el laboratorio con las siguientes características: 1) un nivel de resistividad de 18,2 MegaOhmios.cm a 25°C y 2) un nivel de carbonato orgánico total inferior a 10 partes por billón (ppb). Los sistemas *Milli-Q*[™] constan de varias etapas de purificación, cada una de ellas

diseñada para eliminar una determinada gama de contaminantes utilizándose, en este caso, el módulo Gradient A10 para la obtención de agua purificada con las características recogidas en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3: Especificaciones agua Milli-Q Gradient A10

ESPECIFICACIONES	
Resistividad (MΩ.cm) a 25 °C	18.2
Nivel de COT (valores típicos)	1-5
Nivel de pirógenos (Eu/ml)	NE
Bacterias (UFC/ml)	<1
Partículas > 0.22 µm (P/ml)	<1
Caudal (L/min)	1.5

Tras el lavado, las muestras fueron incubadas con acetonitrilo (CH_3CN), utilizado como disolvente, al 100% durante 5 minutos, otros 30 minutos con TFA al 5% y acetonitrilo al 50% y se secaron con un sistema *SpeedVac*[®] (*Thermo Scientific*).

En base a experimentos previos^{128, 134} las muestras se redujeron con ditioeritritol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$) en bicarbonato amónico (NH_4HCO_3) y posteriormente fueron alquiladas con iodoacetamida ($\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$), un inhibidor irreversible de todas las cisteína-peptidasas (mediante el mecanismo de alquilación de los residuos catalíticos de la cisteína), en bicarbonato amónico.

Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12,5 ng/µl de tripsina (*Promega*[®], *Madison, WI, USA*) en 25 mM de bicarbonato de amonio (pH 8.5) a 37°C durante toda una noche. La tripsina utilizada es una enzima peptidasa de origen porcino, modificada mediante metilación, que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de los residuos lisina (Lys) y arginina (Arg). Su

actividad máxima se establece a un pH entre 7 y 9 y se inactiva de forma reversible a un pH de 4.

Tras la digestión, los péptidos se extrajeron del gel mediante una solución de 100 mmol/l de bicarbonato amónico (NH_4HCO_3). Estos extractos se liofilizaron y resuspendieron en ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%. Los péptidos se purificaron usando puntas mmol-18 Zip (*Millipore*, Billerica, Mass). Para la espectrometría de masas se mezcló 1 μl de los extractos purificados con 1 μl de matriz de α -ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*) en acetonitrilo (CH_3CN) al 50%. Un microlitro de esta mezcla se cargó en una placa de MALDI (*Pro MS MALDI Genomic Solutions*) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente.

La fuente de ionización MALDI se asocia a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ion padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

La espectrometría de masas se realizó utilizando el aparato 4700 *Proteomic Analyzer* (*Applied Biosystem, Framingham, MA, USA*) operando en el modo reflector positivo. Todos los espectros de masas se calibraron usando una mezcla de calibradores estándar (*Applied Biosystem, Framingham, MA, USA*). Para el análisis automático de los datos de masa molecular se utilizó el 4000 *Series Explorer Software*

(*Applied Biosystems, Framingham, MA, USA*) y los espectros obtenidos en modo MS y MS/MS fueron combinados a través del *GPS Explorer Software (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)*.

Con el análisis en modo MS se obtuvo el espectro de masas o “huella peptídica” y algunos de los péptidos observados se analizaron seguidamente en modo MS/MS. Tras analizar la mezcla de péptidos mediante MS se obtuvo un conjunto de valores de masas moleculares y puntos isoeléctrico. Los péptidos con una relación señal-ruido mayor de 20 se introdujeron en la base de datos *MASCOT 1.9 (MatrixScience, UK)* para la identificación de la proteína (<http://www.matrixscience.com>). Esta base es una potente máquina de búsqueda para identificar proteínas de bases de datos primarias y permite integrar todos los métodos de búsqueda probados: la huella peptídica o los fragmentos derivados del modo MS/MS. Para cada entrada en la base de datos de proteínas la máquina simula la rotura específica de los enlaces que se produce tras la digestión de las proteínas con la tripsina, calcula las masas de los péptidos previstos y compara el conjunto de valores de masas calculadas con los obtenidos de forma experimental. Para realizar la búsqueda, se introdujo el espectro y después de un corto período de tiempo, se recibieron los resultados.

5.3. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT (WB).

Los niveles de expresión de proteínas como la triosafosfato isomerasa, piruvato-deshidrogenasa y la proteína transportadora GLUT-3 fueron analizados mediante Western Blot. También denominada inmunoblot, esta técnica analítica se

utiliza para detectar determinadas proteínas específicas en una muestra concreta incluidas muestras complejas. Mediante electroforesis en geles en condiciones desnaturalizantes (SDS) se separan las proteínas en función de un criterio: peso molecular. Posteriormente las proteínas se transfieren a una membrana adsorbente (nitrocelulosa o PVDF) y se impregna con anticuerpos específicos para dicha proteína. Los complejos de unión antígeno-anticuerpo son finalmente detectados mediante fluorescencia o por actividad enzimática entre los métodos más comúnmente empleados. Mediante esta técnica se puede evaluar la presencia de una proteína determinada en un extracto, y cuantificar su cantidad relativa respecto a otras proteínas de la mezcla.

5.3.1 Material utilizado

- Segmentos vasculares homogeneizados (muestras de aorta aneurismática y controles).
- Papel de filtro.
- Tampón *Laemmli* (1x).
- SDS-PAGE al 15%.
- PBS para lavado.
- Ácido bicinonínico (BCA).
- Azul de *Coomassie*.
- Membrana de nitrocelulosa (Immobilion-P; *Millipore, USA*)
- Tampón TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween 20*).
- Anticuerpos primarios monoclonales:
 - Anti- triosafosfato isomerasa (*Santa Cruz Biotechnology®*)

- Anti-piruvato deshidrogenasa (Santa Cruz *Biotechnology*®)
- Anti-GLUT 3 (Calbiochem®)
- Anticuerpos secundarios:
 - IgG anti-conejo (GE-Healthcare®)
 - IgG anti-cabra (Santa Cruz *Biotechnology*®)
- Peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*).
- *Kit ECL plus* (*Amersham Biosciences, Upp, Sweden*. cod. RPN 2132)
- Marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich, St Louis, MI, USA*)

5.3.2 Preparación de las muestras

Los homogeneizados de aorta sana y aneurismática de los distintos grupos a estudio fueron solubilizados en tampón *Laemmli*. Este tampón está especialmente diseñado para la preparación de muestras proteicas en geles de poliacrilamida. Con un pH de 6,8 aproximadamente, consta de los siguientes componentes:

- SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*).....4%
- Glicerol.....20%
- 2-mercaptoetanol.....10%
- Azul de bromofenol.....0.004%
- M Tris-HCl.....125 mM

El agente detergente SDS proporciona a todas las proteínas carga negativa en un intervalo regular, dando a cada proteína la misma carga negativa total. De esta forma es posible separar las proteínas por su tamaño y no por su carga, como se

describía previamente. El SDS también desnatura las proteínas y sus subunidades para ayudar a la separación en base al tamaño y no a la estructura tridimensional.

La adición de glicerol en el tampón incrementa la densidad del mismo, de forma que la muestra desciende hasta el fondo, minimizándose las pérdidas de proteína en el tampón.

El 2-mercaptoetanol se usa para reducir los enlaces disulfuro intra e intermoleculares y permitir una adecuada separación en base a la forma y no por el tamaño.

A su vez, el azul de bromofenol sirve como indicador de la muestra de proteínas, permitiendo su visualización de manera fácil.

Finalmente, el M-Tris, componente habitual de los tampones, representa la abreviación del compuesto orgánico conocido como tris(hidroximetil)aminometano ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$). Posee una constante de disociación (pK_a) de 8.07 a 25°C, lo que implica que dicho tampón va a tener una gran efectividad para mantener un determinado rango de pH simulando las condiciones fisiológicas del ser humano.

5.3.3 Electroforesis en gel

Las proteínas se separaron en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% según su peso molecular al aplicar una carga eléctrica. Una misma cantidad de proteína (20 μg /pocillo), estimada por la reacción

colorimétrica del reactivo BCA (detallada en el apartado **4.2.2.c. Primera dimensión**) fueron pinchadas en cada pocillo del gel. En el primer pocillo se cargaron marcadores de peso molecular (*Sigma-Aldrich*) para el cálculo de la masa molecular, monitorizar la movilización en el gel de electroforesis y como control positivo para el análisis. Los geles fueron posteriormente teñidos con azul de *Coomassie* (derivado del fenilmetano, $C_{47}H_{49}N_3NaO_7S_2$). Esta solución de tinción contiene los siguientes compuestos:

- Azul de Coomassie.....0.5 g
- Metanol.....250 ml
- Ácido acético.....50 ml
- Agua destilada(hasta 500 ml)

Tras dos horas en contacto con la solución se procedió a desteñir la membrana con ácido acético y metanol.

5.3.4 Transferencia y bloqueo de proteínas

La transferencia de proteínas (*blotting*) consiste en la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas para identificarlas, a continuación, mediante sistemas de tinción. En el caso de la técnica de WB, tras la separación proteica en los geles SDS-PAGE 15%, las muestras son transferidas a una membrana tras a aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel.

Este proceso de *blotting* consta de cinco fases:

1. Inmovilización de las proteínas sobre la membrana, mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión...) o aplicación directa.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos (que a su vez, son proteínas).
3. Incubación del *blot* con anticuerpos primarios contra la/s proteína/s de interés.
4. Incubación del *blot* con anticuerpos secundarios, o reactivos, que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
5. Incubación con los sustratos apropiados en aquellas bandas de proteínas marcadas con enzimas para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

La transferencia a una membrana aporta una serie de ventajas sobre el gel: la tinción y lavado es más rápida, pueden identificarse cantidades menores de proteínas (pues se concentran en la superficie), no se diluyen en todo el espesor del gel y es más fácil de manejar que el propio gel.

En este caso las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Immobilion*[®]-P) mediante electrotransferencia semihúmeda, para lo cual se utilizó un tampón de transferencia (250 mM de glicina, 15% de metanol, 25 mM de Tris y agua destilada). Las membranas de tipo *Immobilion*[®]-P tienen una gran adsorción a las

proteínas, de modo que se evita la pérdida de las mismas durante la transferencia. Tienen una estructura de poro abierto, lo cual facilita el acceso a las proteínas unidas o eliminar las que no lo han hecho. Los poros tienen un diámetro de 0.45 μm , lo que les hace aptos para ser utilizados en la mayoría de los WB, especialmente para proteínas de $> 20 \text{ kDa}$.

Las membranas de nitrocelulosa fueron sometidas a 20 V durante una hora. Posteriormente fueron lavadas con metanol seguido de un tampón neutro (PBS), depositándose sobre el papel de filtro.

Dado que las proteínas tienen que unirse a la membrana de forma inespecífica, dichas membranas fueron bloqueadas (es decir, los lugares de unión de la membrana que no se habían ocupado tras la transferencia fueron bloqueados) durante toda la noche a 4°C con un 5% (w/v) de leche en polvo no grasa en TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween-20*). De no hacerlo, los anticuerpos que se utilizan en la detección de las proteínas de interés quedarían adheridos a la membrana de forma inespecífica (dado que son también proteínas), dificultando la distinción del complejo antígeno-anticuerpo que se forma con la proteína a estudio.

El TBS-T es un tampón utilizado para mantener el pH en un rango relativamente estrecho. La formulación utilizada fue la siguiente:

- Tris-HCl (pH 5.2).....20 mmol/l
- NaCl.....137 mmol/l
- Tween-20.....0.1%

Como se ha comentado con anterioridad, el Tris tiene una gran efectividad para mantener un determinado rango de pH y simular así las condiciones fisiológicas del animal o del cuerpo humano. Al añadir ácido clorhídrico (HCl) podemos ajustar el pH hasta 5.2. El NaCl proporciona una concentración de sal isotónica. El polisorbato 20 o monooleato de Polioxietileno Sorbitan, conocido comercialmente como *Tween 20*, es un surfactante polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea utilizado como detergente y emulsionante. Se utiliza para evitar las uniones no específicas de los anticuerpos, reduciendo así el ruido de fondo y los falsos positivos.

5.3.5 Marcaje de las proteínas

Una vez transferidas y bloqueadas las membranas, éstas fueron incubadas con anticuerpos monoclonales específicos durante 12 h a 4°C. Las membranas se lavaron posteriormente con PBS al 0.5% de *Tween* (tres veces durante 5 minutos) para eliminar el anticuerpo primario no unido y, después, fueron incubadas con anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente, que reconocían de forma específica una región concreta del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron de origen animal: anti-conejo o anti-cabra, conjugados con HRP (peroxidasa de rábano) (Tabla 5.4).

Tabla 5.4: Anticuerpos utilizados en Western Blot.

PROTEÍNA	ANTICUERPO PRIMARIO (dilución)	ANTICUERPO SECUNDARIO (dilución)
Triosafosfato isomerasa	sc-30145 (1:1000)	IgG anti-conejo NA934V (1:1500)
Piruvato deshidrogenasa	sc-7140 (1:1000)	IgG anti-cabra sc-2020 (1:1000)
GLUT-3	400062 (1:1000)	IgG anti-conejo NA934V (1:2500)

5.3.6 Análisis

La detección final de las proteínas se llevó a cabo mediante una reacción quimioluminiscente y evaluación por densitometría. Para ello se utilizó el sistema *ECL plus* (Amersham Biosciences) previo lavado con PBS. En este caso, el sustrato Lumigen PS-3 es convertido a un éster de acridinio en una reacción catalizada por HRP (peroxidasa de rábano), conjugada en los anticuerpos secundarios previos.

El kit comercial contiene la Solución A (sustrato que contiene el tampón *Tris*) y la solución B (sustrato de acridinio con dioxano y etanol). Ambas soluciones se mezclan en una proporción 40:1.

Para la quimioluminiscencia se requirió la incubación de las membranas con el sustrato (ECL-Lumigen). El éster reacciona con el peróxido en condiciones alcalinas y emite una luz que se lee a 428 nm con un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos una vez iniciada la reacción, tal y como se esquematiza en la Figura 5.2.

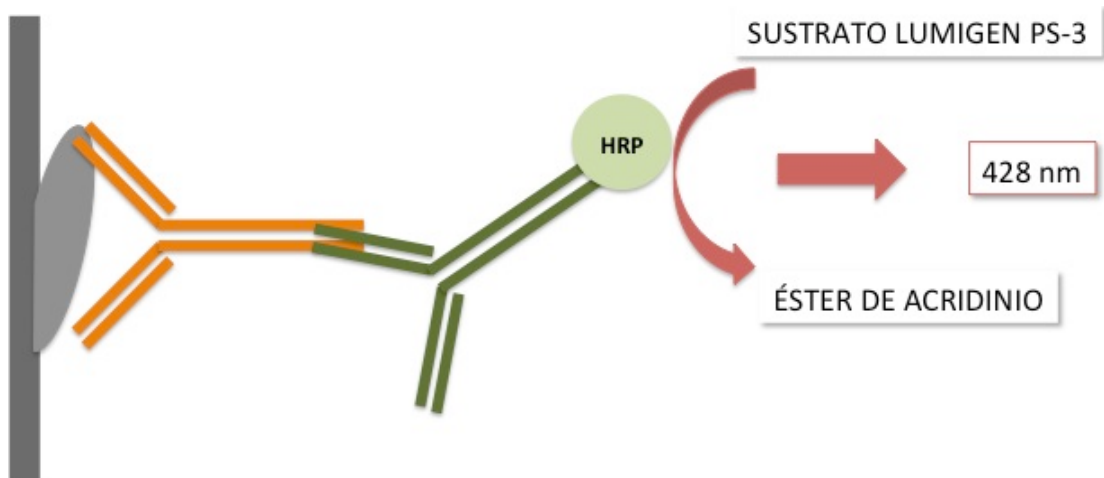


Figura 5.2: Modelo esquemático de la identificación proteica mediante quimioluminiscencia. HRP: peroxidasa de rábano.

La imagen obtenida fue analizada por densitometría para evaluar la cantidad relativa de la proteína y cuantificar el resultado en términos de densidad óptica (unidades arbitrarias) mediante el *software Quantity One*.

5.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

5.4.1 Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa y triosa fosfato isomerasa

La actividad enzimática tanto de la 1,6-bifosfato aldolasa y la triosafosfato isomerasa se determinó en la propia pared aórtica de las muestras obtenidas según el método descrito por *Misset y Opperdoes*¹³⁵ en 1984 para la purificación simultánea de la hexoquinasa, fructosa 1,6-bifosfato aldolasa, triosafosfato isomerasa y fosfoglicerato quinasa del *Trypanosoma brucei*, en el que todas las enzimas fueron estudiadas a 25°C en un volumen final de 1 ml, con un tampón de trietanolamina/HCl 0.1 M que confería un pH de 7,6. El cambio de absorbancia a 340 nm se medía

durante 10 minutos, y se consideró como una unidad enzimática a la cantidad de enzima capaz de catalizar un micromol de sustrato por minuto a 25°C.

Aplicado a los estudios que aquí se presentan, se resumen a continuación la determinación de la actividad enzimática de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa y triosafosfato isomerasa en ambos grupos de muestras.

Se incubaron 240 µg de proteínas totales de las muestras aórticas con los elementos recogidos en la Tabla 5.5 para cada enzima.

Tabla 5.5: Determinación de la actividad enzimática de aldolasa y triosa fosfato isomerasa.

Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa	
<i>Tris</i> -HCl (pH 7,4)	100 mmol/l
Solución de fructosa 1,6-bifosfato	58 mmol/l
β-nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)	4 mmol/l
α-glicerofosfato deshidrogenasa/ triosa fosfato isomerasa	50 U/ml

Triosafosfato isomerasa	
<i>Tris</i> -HCl (pH 7,4)	100 mmol/l
Gliceraldehído-3-fosfato	58 mmol/l
β-nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)	4 mmol/l
α-glicerofosfato deshidrogenasa/ aldolasa	50 U/ml

El *Tris*-HCl (T-1503, *Sigma-Aldrich*) se utilizó para mantener el pH en 7,4. La actividad de ambas enzimas se determinó a 340 nm y a 25°C en cubetas de plástico, con la solución formada por el sustrato β-NADH (N-8129, *Sigma-Aldrich*) junto con

la fructosa 1,6-bifosfato (F-0752, *Sigma-Aldrich*) y la α -glicerofosfato deshidrogenasa/triosafosfato isomerasa (G-6755, *Sigma-Aldrich*) para evitar la saturación de la muestra en el caso de la determinación de la actividad de fructosa 1,6-bifosfato y la gliceraldehído-3-fosfato (G-5251, *Sigma-Aldrich*) y la α -glicerofosfato deshidrogenasa/aldolasa (A-2714, *Sigma-Aldrich*) para la determinación de la actividad en el caso de triosafosfato isomerasa.

Para la medición de la actividad se utilizó el espectrofotómetro *BioAquarius* (CECIL[®]) observando el cambio de absorbancia cada 30 segundos hasta completar 10 minutos. De esta forma se cuantificó la disminución del sustrato NADH en el tiempo. Ambas actividades fueron determinadas 5 minutos antes y 5 minutos después de que las muestras fueran añadidas a la reacción.

5.4.2 Lactato deshidrogenasa

La actividad de la lactato deshidrogenasa fue determinada en la muestra aórtica abdominal utilizando 0,1 g de tejido/muestra, según las instrucciones del fabricante del kit comercial (K-726-500; *BioVision Research Products, Mountain View, Calif, USA*). Se trata de un ensayo colorimétrico en el que la LDH reduce NAD a NADH que interacciona con una sonda específica produciendo un color con absorbancia máxima a 450 nm. Este ensayo se caracteriza por su sensibilidad y rapidez (30 min) pudiendo detectar de 1-100 MU/ml de LDH de forma directa en las muestras.

5.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PIRUVATO Y LACTATO

5.5.1 Determinación del contenido de piruvato

El contenido de piruvato presente en los segmentos de aorta aneurismática y los controles se cuantificó utilizando el *Pyruvate Assay Kit* (K609-100; *BioVision Research Products*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El piruvato es oxidado por la piruvato oxidasa mediante reacciones enzimáticas colorimétricas ($\lambda = 570$ nm) y fluorescencia (Ex/Em= 535/587 nm), siendo el color/ fluorescencia proporcional al contenido del piruvato de la muestra.

5.5.2 Determinación del contenido de lactato

El contenido de lactato presente en los segmentos de aorta aneurismática y los controles se cuantificó utilizando el *Lactate Assay Kit* (K609-100; *BioVision Research Products*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El lactato reacciona con una mezcla enzimática proporcionada en el kit generando un producto que al interaccionar con una sonda específica produce emisión a 570 nm) y fluorescencia (Ex/Em=535/587 nm). No es preciso el pretratamiento o purificación de la muestra, pudiendo detectar concentraciones entre 0,001-10 mM de varias muestras de lactato.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete informático SPSS. Las variables cuantitativas se expresan según su media \pm EEM. Se realizaron análisis de regresión lineal simple y multivariable para valorar los potenciales efectos de la edad. El nivel de expresión de cada proteína fue considerado una respuesta variable y el estado de la enfermedad aórtica (AAA=1 o control=0) fue considerada una variable independiente. La edad fue usada como una covariante en el modelo multivariable.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS

Se incluyeron muestras aórticas aneurismáticas de un total de 13 pacientes y se utilizaron como grupo control las muestras recogidas de un total de 12 donantes de órganos por daño cerebral irreversible. Las características demográficas y comorbilidades asociadas de los pacientes portadores de AAA (grupo AAA) y donantes en muerte encefálica (grupo control) se exponen en la Tabla 6.1.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al sexo ni factores de riesgo cardiovascular entre el grupo AAA y control. Sí se objetivó una edad significativamente mayor en los pacientes con AAA ($P < 0,001$), así como la presencia de trombo intraluminal, ausente en los pacientes del grupo control. Todos los pacientes con AAA mostraron algún grado de trombo intraluminal en la TAC realizada preoperatoriamente. No obstante, la preparación de las muestras aórticas para su posterior análisis proteómico incluyó el lavado exhaustivo en suero salino de todas ellas, con la consecuente retirada del trombo de las muestras aneurismáticas por lo que dicho material no fue procesado en el estudio. Respecto al tamaño aórtico, era de esperar una diferencia significativa en el diámetro aórtico medio entre los pacientes en el grupo AAA y control, dado que es una característica definitoria del primer grupo.

Tabla 6.1: Características clínicas de los pacientes incluidos.

	Grupo AAA (n=13)	Grupo control (n=12)	P
Edad (años), <i>media</i> \pm <i>EEM</i>	69.31 \pm 4.38	53.91 \pm 8.30	0.001
Sexo (hombres/mujeres)	11/2	9/3	-
Tamaño del AAA (cm), <i>media</i> \pm <i>EEM</i>	6.73 \pm 0.4	<2	0.001
Trombo intraluminal	13/13	-	-
Factores de riesgo cardiovascular			
Tabaquismo	12/13	10/12	-
Hipertensión	8/13	7/12	-
Dislipemia	7/13	8/12	-
Diabetes Mellitus	2/13	0/12	-

6.2 DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO

Las siguientes proteínas relacionadas con el metabolismo energético fueron identificadas en el proteoma de los aneurisma de aorta abdominal:

- Triosafosfato isomerasa
- Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- Isotipos α -enolasa (1 y 2)
- Lactato deshidrogenasa
- Fosfoglicerato mutasa
- Isotipos mitocondriales de aldehído deshidrogenasa (1 y 2)
- Aldehído deshidrogenasa citosólica
- Cadena β de ATP-sintasa

La Figura 6.1 muestra un ejemplo del proteoma obtenido de una de las muestras aórticas tras la electroforesis bidimensional. Cabe destacar el gran número de proteínas detectadas como parte del proteoma aórtico. Sin embargo, dado el objetivo de esta tesis, nos centraremos en las proteínas relacionadas con el metabolismo energético.

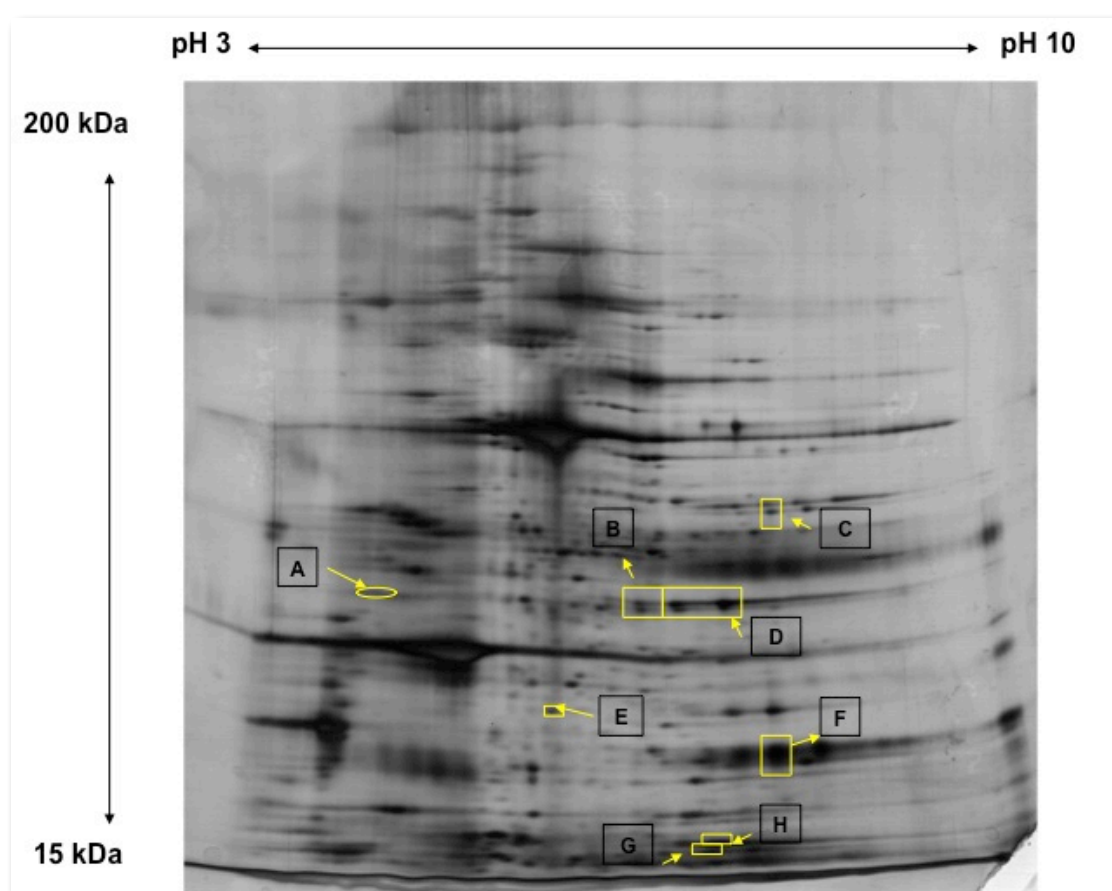


Figura 6.1: Gel tipo de electroforesis bidimensional del proteoma de un AAA. A: ATP sintasa; B: aldehído deshidrogenasa citosólica; C: α -enolasa; D: aldehído deshidrogenasas mitocondriales; E: lactato deshidrogenasa; F: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; G: triosafosfato isomerasa; H: fosfoglicerato mutasa.

Los puntos encontrados en el gel fueron analizados densitométricamente e identificados en base a la comparación con los mapas de expresión proteica de aorta ascendente humana, publicados previamente¹³⁶.

Como puede objetivarse en la Figura 6.2 y Tabla 6.2 se determinó una disminución en el nivel de expresión de triosafosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa citosólica entre los proteomas de muestras aneursimáticas y grupo control. Los niveles de expresión de otras proteínas relacionadas con el metabolismo energético identificadas en el proteoma (isotipos de α -enolasa, lactato deshidrogenasa, fosfoglicerato mutasa, isotipos mitocondriales de aldehído deshidrogenasa, cadena β de ATP-sintasa) no mostraron diferencias en sus niveles de expresión entre ambos grupos (Tabla 5.2).

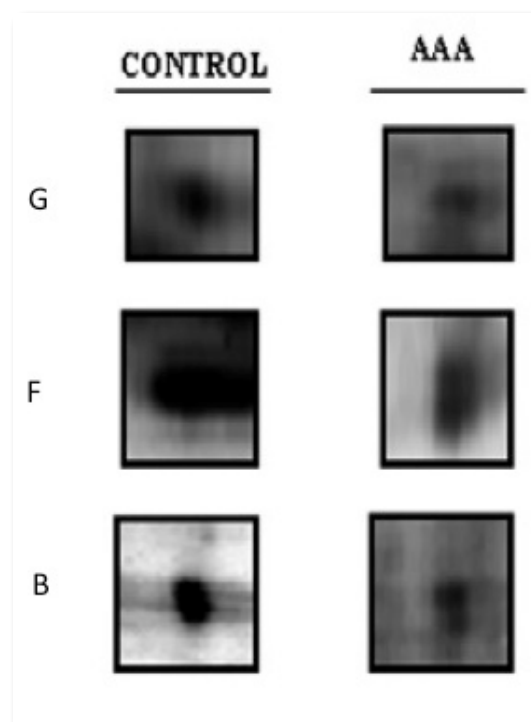


Figura 6.2: Puntos o *spots* del gel de electroforesis con las proteínas de expresión diferencial entre el grupo AAA y el grupo control. G: triosafosfato isomerasa. F: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. B: aldehído deshidrogenasa citosólica.

Tabla 6.2: Expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético en AAA y controles.

Proteína	Controles (n=12)	AAA (n=13)	<i>P</i> ajustada ^a
Triosafosfato isomerasa	104,17 ± 12,61	55,28 ± 16,21	0,045*
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	199,441 ± 24,40	114,05 ± 25,89	0,007*
Aldehído deshidrogenasa citosólica	180,79 ± 31,39	83,90 ± 27,54	0,037*
α- Enolasa			
• Isotipo 1	70,24 ± 10,57	75,59 ± 8,35	0,348
• Isotipo 2	114,81 ± 19,17	100,32 ± 16,38	0,400
Lactato deshidrogenasa	134,30 ± 28,29	123,46 ± 30,60	0,501
Fosfoglicerato mutasa	166,35 ± 31,85	132,43 ± 29,38	0,899
Aldehído deshidrogenasa mitocondrial			
• Isotipo 1	268,24 ± 44,98	176,47 ± 27,54	0,327
• Isotipo 2	299,24 ± 44,21	210,49 ± 40,51	0,680
Cadena β ATP sintasa	72,94 ± 13,91	63,13 ± 11,58	0,677

^a Los valores *P* fueron calculados por ecuaciones de regresión lineal con la expresión proteica como variable dependiente. La edad fue incluida como covariante dentro del modelo para proporcional valores *P* ajustados. Los resultados se exponen como media ± EEM. **P*<0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Siguiendo los pasos referidos en el apartado **5. MATERIALES Y MÉTODOS**, los puntos donde se encontraron diferencias en las mediciones densitométricas entre los mapas de los pacientes con AAA y de los controles fueron posteriormente identificados por espectrometría de masas. Así se obtuvieron los espectros o huellas peptídicas de triosafosfato isomerasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Figura 6.3).

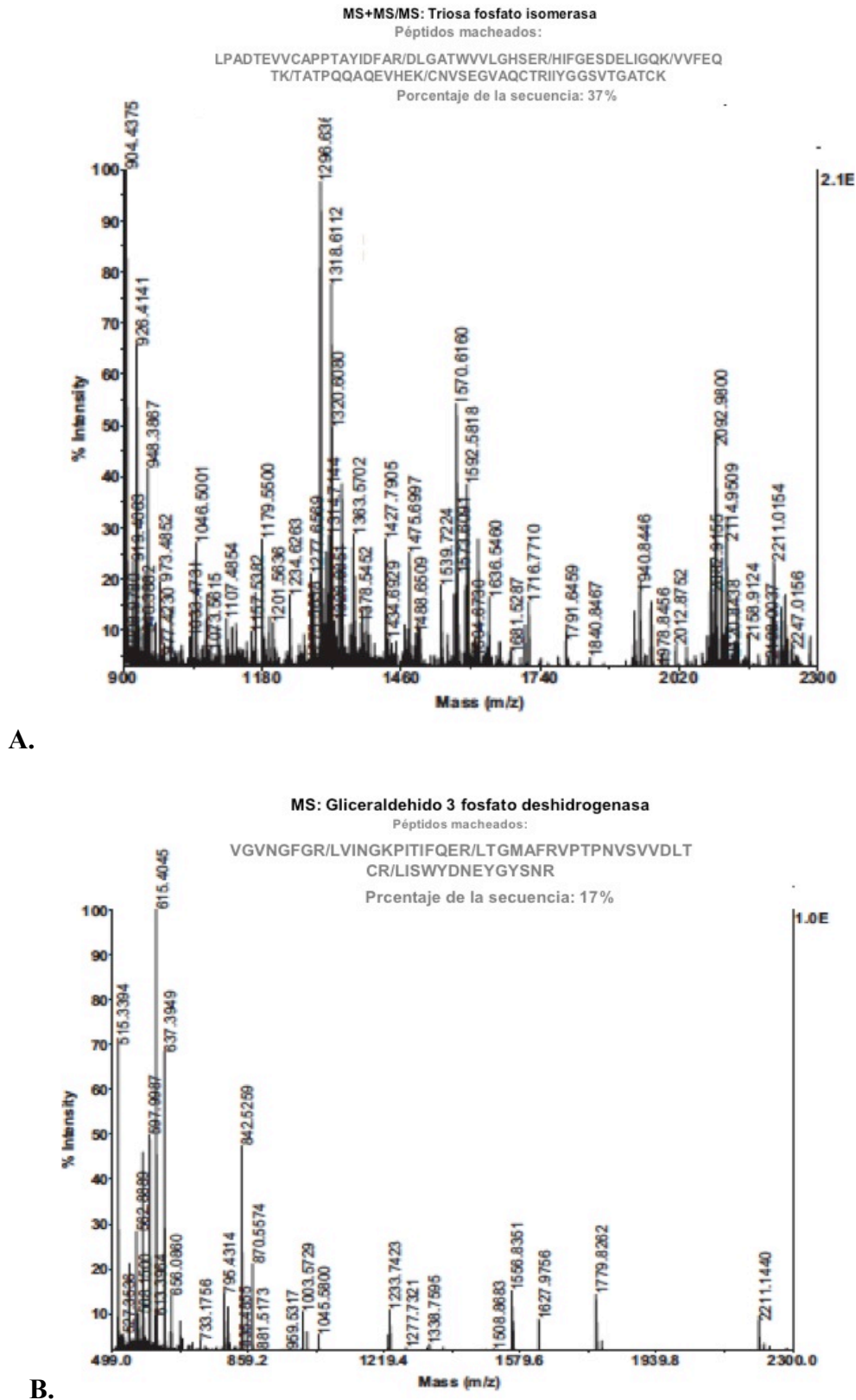


Figura 6.3: Espectrometría de masas para la identificación proteica. A: espectro de triosafosfato isomerasa. B: espectro de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Los péptidos asociados a cada proteína aparecen en la figura y fueron analizados utilizando la base de datos MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) para la identificación proteica. Queda reflejado el porcentaje de secuencia.

En la Tabla 6.3 quedan detalladas las masas experimentales y los puntos isoelectricos (pI) de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas así como el método de confirmación utilizado.

Tabla 6.3: Espectrometría de masas. Métodos, masas y pI.

Proteína	Método de confirmación	Masa experimental (kDa)	pI
Triosafosfato isomerasa	MS/MS	27,28	6,51
G3PDH	MS	35,96	8,44

G3PDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. MS: espectrometría de masas. MS/MS: espectrometría de masas en tándem.

6.3 DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

En los proteomas obtenidos de las muestras analizadas del grupo AAA, el nivel de expresión de triosafosfato isomerasa estaba significativamente reducido respecto al grupo control. Este hallazgo fue confirmado tras el análisis por Western Blot (Figura 6.4). Este análisis también reveló una disminución de la expresión de la piruvato deshidrogenasa en el grupo AAA respecto al control, complejo enzimático responsable de la conversión de piruvato en acetil-CoA para su entrada en el ciclo del ácido cítrico. El análisis densitométrico del Western Blot se realizó mediante regresión lineal utilizando la edad como covariante, la expresión proteica como variable de respuesta y el estado de enfermedad (AAA) como variable independiente.

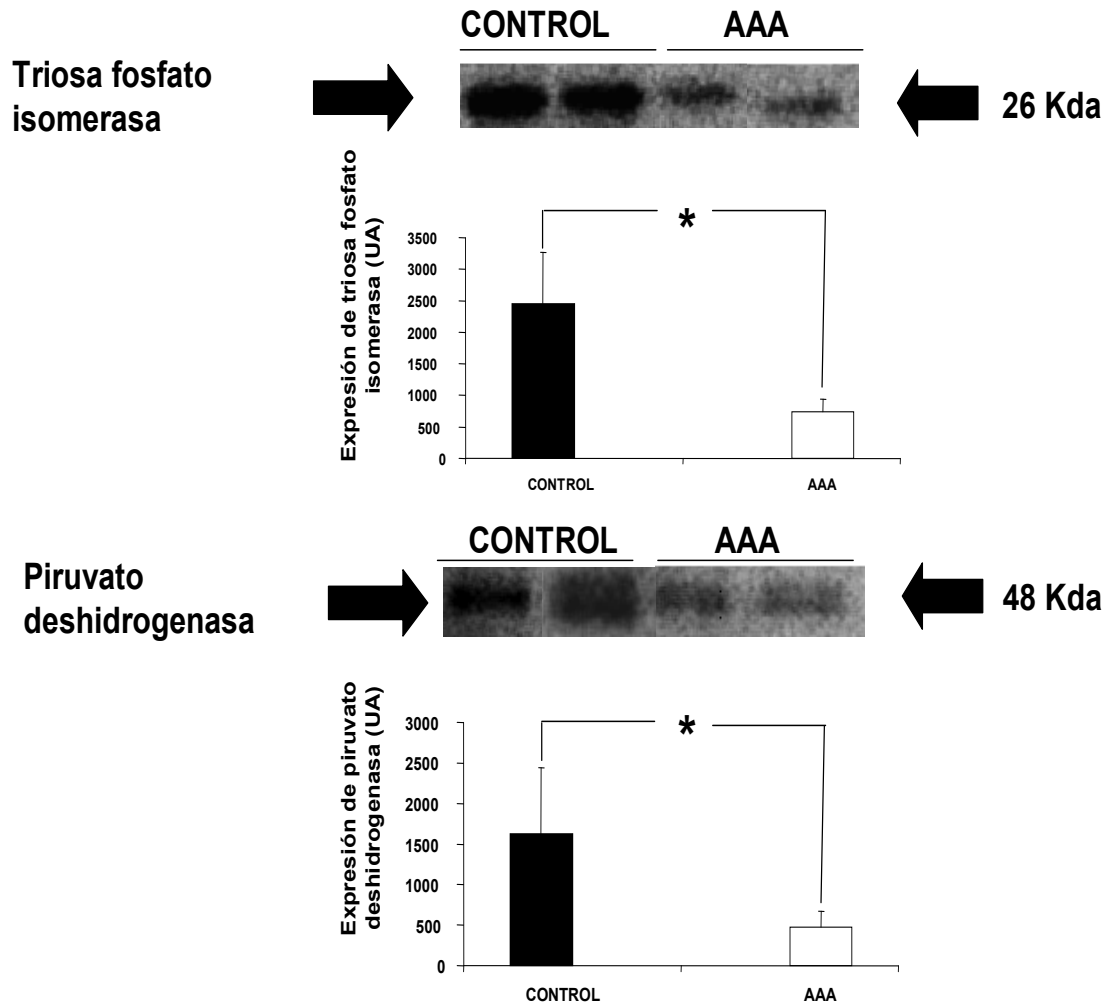


Figura 6.4: Análisis Western Blot de la triosafosfato isomerasa y piruvato deshidrogenasa. Los diagramas de barras indican los resultados tras el análisis densitométrico en unidades arbitrarias (UA) del Western Blot. Los valores densitométricos se expresan como media \pm EEM. * $P < 0,05$ respecto al grupo control.

Asimismo, se detectó una disminución en la expresión de la proteína transportadora de glucosa GLUT-3 en las muestras procedentes de pacientes con AAA tal y como se visualiza en la Figura 6.5.

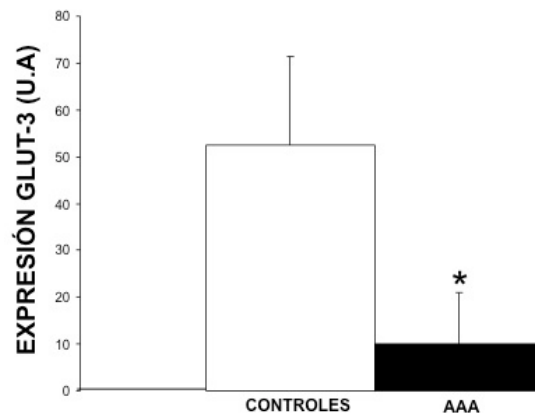


Figura 6.5: Diagrama de barras tras el análisis densitométrico en unidades arbitrarias (UA) del Western Blot. * $P < 0,05$ respecto al grupo control.

6.4 MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Se determinó la actividad enzimática de la triosafosfato isomerasa, 1,6-bifosfato aldolasa y lactato deshidrogenasa.

La reducción en la expresión de la enzima triosafosfato isomerasa, confirmada mediante Western Blot, como se refería previamente, se vio acompañada de una reducción significativa en su actividad enzimática (Figura 6.6). Los valores medios de actividad enzimática fueron $1,56 \pm 0,54$ UA para el grupo AAA frente a $56,62 \pm 0,67$ UA en el grupo control.

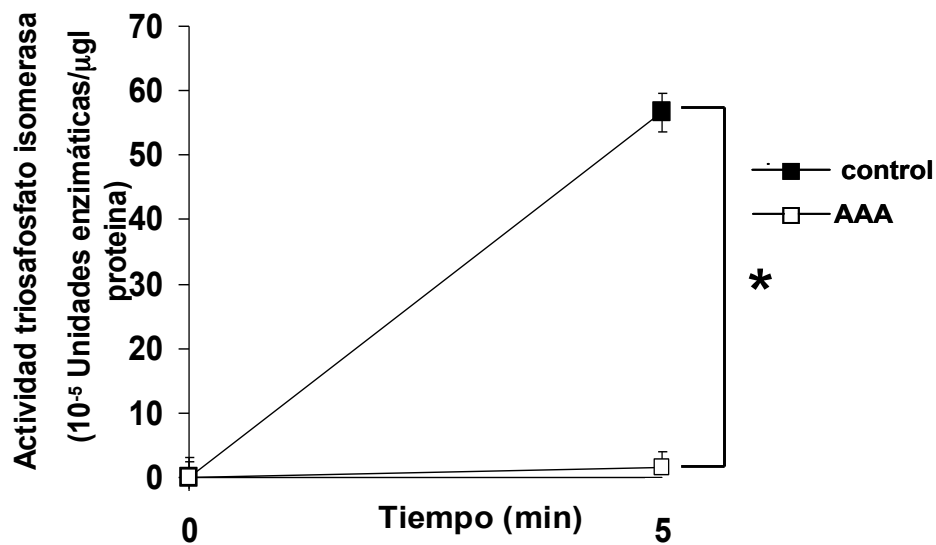


Figura 6.6: Gráfica que refleja la actividad enzimática de la triosa fosfato siomerasa en el grupo AAA y control. Los resultados se presentan como 10⁻⁵ unidades enzimáticas/μg de proteína aórtica. * P < 0,05 respecto al grupo control.

Por el contrario, la medición de la actividad enzimática de la 1,6-bifosfato aldolasa (aldolasa) no mostró diferencias entre ambos grupos (Figura 6.7), con valores medios de actividad enzimática de $0,79 \pm 0,24$ UA para el grupo AAA frente a $0,86 \pm 0,16$ UA en el grupo control.

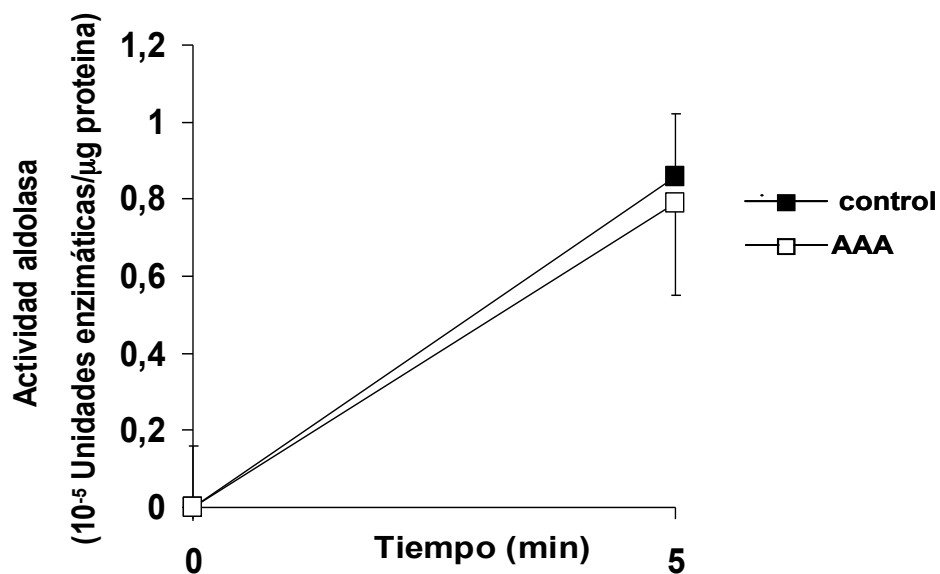


Figura 6.7: Gráfica que refleja la actividad enzimática de la 1,6-bifosfato aldolasa (aldolasa) en el grupo AAA y control. Los resultados se presentan como 10⁻⁵ unidades enzimáticas/μg de proteína aórtica.

Del mismo modo, no se observaron diferencias en la actividad de la lactato deshidrogenasa, con niveles medios de actividad enzimática de $21,88 \pm 4,17$ UA para el grupo AAA frente a $17,24 \pm 2,94$ UA en el grupo control (Figura 6.8).

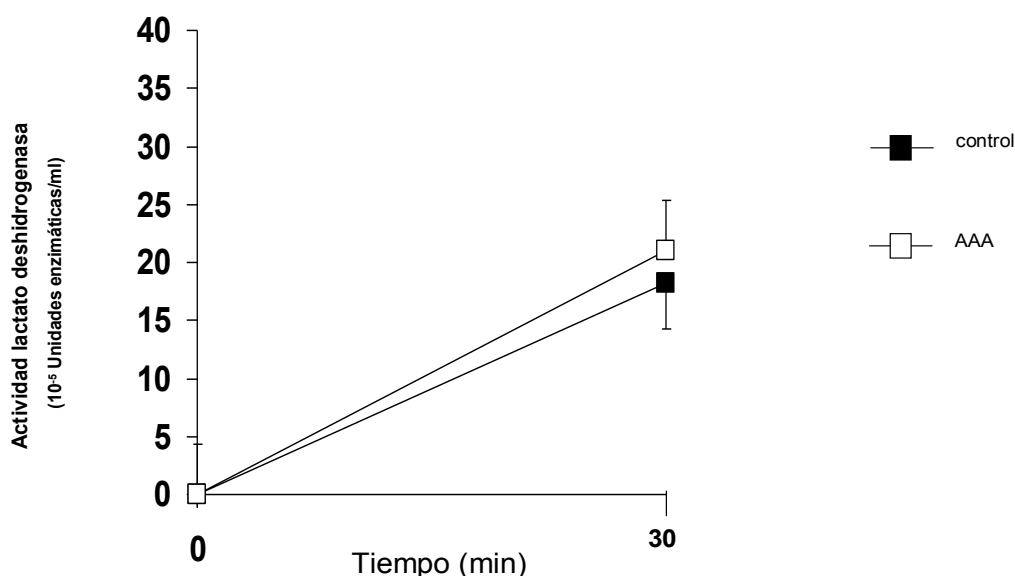


Figura 6.8: Gráfica que refleja la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa en el grupo AAA y control. Los resultados se presentan como 10^{-5} unidades enzimáticas/ μ g de proteína aórtica. La actividad enzimática se determinó a tiempo 0 y 30 minutos después de la adición del homogeneizado tisular al agente reactivo.

6.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PIRUVATO Y LACTATO

Se midieron las concentraciones de piruvato y lactato en ambos grupos mediante los kits referidos en **5. MATERIALES Y MÉTODOS**.

Así, según refleja la Figura 5.9, se objetivó un incremento del contenido de piruvato en las muestras del grupo AAA comparadas con los controles. Los valores medios obtenidos fueron $1,83 \pm 0,66$ mmol/L/ μ g de proteína en el grupo AAA y $0,38 \pm 0,22$ mmol/L/ μ g de proteína en el grupo control.

Del mismo modo, se objetivó un incremento en el contenido de lactato en las muestras del grupo AAA respecto al grupo control (Figura 6.9) con valores medios de $0,24 \pm 0,04$ mmol/L/ μ g de proteína en el grupo AAA y $0,17 \pm 0,03$ mmol/L/ μ g de proteína en el grupo control.

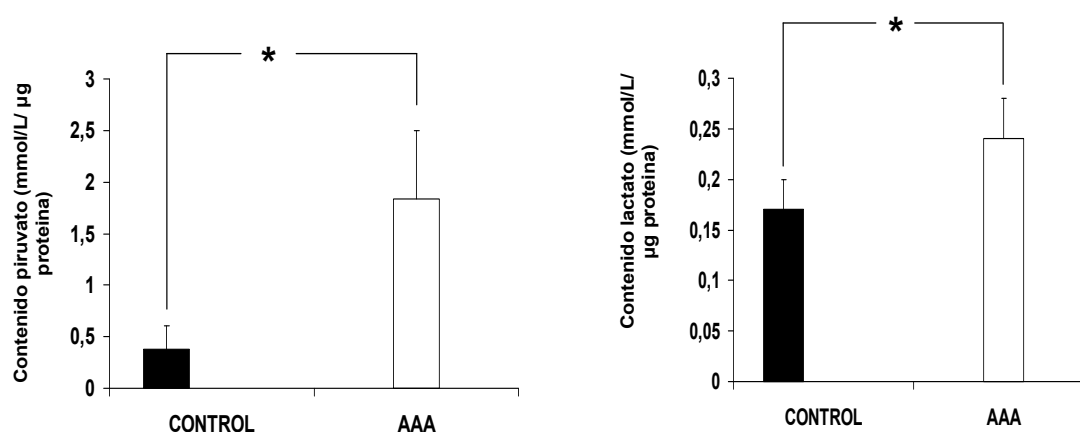


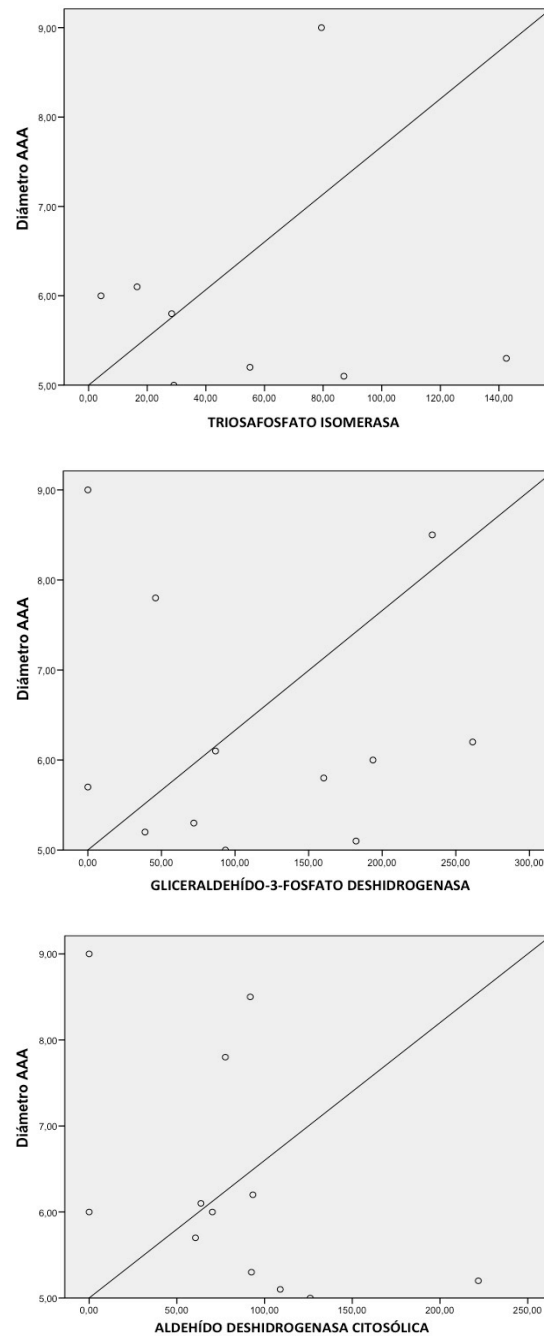
Figura 6.9: Diagrama de barras con el contenido de piruvato y lactato en el grupo control y AAA, respectivamente. Los resultados se expresan en mmol/L/ μ g de proteína aórtica como media \pm EEM. El contenido de piruvato y lactato se consideró como variable respuesta, la enfermedad aórtica (AAA) como variable independiente y la edad como covariante en el análisis de regresión. * $P < 0,05$.

6.6 CORRELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EXPRESIÓN PROTEICA.

Se realizó un estudio de correlación entre el diámetro aórtico de las muestras obtenidas y el nivel de expresión de triosafosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa citosólica, dada su expresión significativamente diferencial entre ambos grupos de estudio. Dada la distribución asimétrica de los valores del diámetro aneurismático de las muestras, se obtuvo, mediante pruebas no paramétricas, el coeficiente de correlación de Spearman. No se

RESULTADOS

pudo demostrar una correlación directa o inversamente proporcional entre ambas variables tal y como muestra la Figura 6.10.



		TRIOSAFOSFATO ISOMERASA	G3PDH	ALDEHÍDO DH CITOSÓLICA
DIÁMETRO AAA	Correlación Spearman	-,025	-,048	-,482
	Sig. (bilateral)	,952	,883	,113
	N	8	12	12

Figura 6.10: Gráficas de correlación entre el diámetro aneurismático y los niveles de expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo. *G3PDH*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

6.7 INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON ESTATINAS EN LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

Varios estudios experimentales y clínicos defienden el efecto protector de las estatinas sobre el crecimiento aneurismático en relación a efectos pleiotrópicos de estas sustancias. El mecanismo principal propuesto radica en la disminución de la síntesis de MMP-9 y efecto antiproteolítico.

De los 13 pacientes con AAA incluidos, 5 de ellos habían recibido estatinas durante al menos un año antes de ser intervenidos quirúrgicamente. Los 8 restantes no tomaban estatinas. Respecto al grupo control (donantes), no se dispuso de dicha información dado que el proceso e historia clínica de los donantes es anónimo.

Se comparó el nivel de expresión proteica de las proteínas relacionadas con el metabolismo que habían mostrado diferencias significativas en el grupo AAA respecto al grupo control. Tal y como expone la Tabla 6.4, no se objetivaron diferencias en el nivel de expresión de dichas proteínas entre los pacientes que habían recibido estatinas y los que no.

Tabla 6.4: Diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo en pacientes bajo tratamiento/ sin tratamiento con estatinas en el momento de la inclusión en el estudio.

	Pacientes con AAA (n=13)		
	Estatinas (n=5)	No estatinas (n=8)	P
Triosafosfato isomerasa	24,66 ± 4,06	73,66 ± 22,49	0,180
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	129,57 ± 37,72	102,96 ± 37,15	0,464
Crf ehído deshidrogenasa citosólica	90,19 ± 13,39	80,75 ± 24,83	0,496

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSION

La presente tesis ha evidenciado modificaciones en el metabolismo energético de la pared vascular en muestras de aorta aneurismática en comparación con muestras de aorta sana. Estas modificaciones orientan a un predominio del metabolismo anaerobio frente al aerobio en los especímenes con enfermedad aneurismática, tanto a nivel de los niveles de expresión proteica como a nivel de la actividad en las enzimas implicadas.

Hasta el momento, diversos estudios han demostrado alteraciones anatomopatológicas a nivel de la pared de los AAA con afectación de las tres capas de la misma: desestructuración y disfunción endotelial, degradación de la matriz extracelular⁵⁶ y participación adventicial con un importante componente inflamatorio⁵⁷. No obstante, escasas son las referencias al estudio de la fuente energética celular capaz de sostener la multitud de procesos (señalización celular, transporte molecular, alteración morfológica, etc..) que resultan en las alteraciones objetivadas en los AAA. A nuestro entender, con el presente trabajo se describe por primera vez, de forma específica, la implicación del metabolismo energético en los aneurismas de aorta abdominal.

La importancia del conocimiento de los procesos metabólicos básicos a nivel celular constituye la herramienta para la comprensión de la fisiología tisular, en este caso aplicada al sistema vascular arterial. Así, es conocido que la función vascular

depende fundamentalmente de su metabolismo energético ¹³⁷, siendo la glucólisis aerobia el patrón normal de obtención de energía en condiciones fisiológicas en la pared vascular ¹³⁸.

En base al estudio proteómico de las muestras analizadas en esta tesis se ha obtenido un nivel de expresión disminuido de triosafosfato isomerasa, enzima clave en la glucólisis al permitir utilizar los 6 átomos de carbono de la glucosa. Este hallazgo fue posteriormente confirmado mediante Western Blot. Asimismo, la disminución en sus niveles se acompañó de una disminución de la actividad enzimática en las muestras con enfermedad aneurismática. De igual forma, los niveles obtenidos en el mapa proteico de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se encontraron disminuidos en los AAA respecto al grupo control. Ambas enzimas suponen puntos clave en la regulación de la glucólisis en las células eucariotas.

Hasta el momento, las escasas referencias al estado metabólico en los aneurismas derivan de los estudios con tomografía de emisión de positrones (PET), a partir de los cuales se ha especulado un incremento en el metabolismo de la pared vascular aneurismática debido a un aumento de la captación de glucosa celular ¹³⁹. Es conocido el componente inflamatorio de los AAA, como se ha explicado en los apartados previos, y la utilización del PET se basa en los hallazgos obtenidos en estudios de las placas ateroscleróticas en la enfermedad oclusiva. La fluorodesoxiglucosa marcada (¹⁸F-FDG) se acumula en las placas ateroscleróticas ricas en macrófagos, constituyendo un método no invasivo para la cuantificación de la actividad de dichas células ¹⁴⁰ por lo que algunos investigadores han mostrado la fiabilidad en la detección de inflamación en la aterosclerosis a partir de estudios con

¹⁸F-FDG PET ¹⁴¹. Respecto a su aplicación en los AAA, trabajos como los de Reeps ¹⁴² o Courtois ¹⁴³ han encontrado una asociación significativa entre la actividad metabólica, cuantificada mediante la captación de ¹⁸F-FDG, con la actividad inflamatoria en la pared aórtica analizada mediante un incremento del infiltrado inflamatorio y aumento de la expresión de MMP. Por ello, se ha considerado la actividad metabólica como un factor predictor de crecimiento y riesgo de rotura en los aneurismas aórticos, de utilidad en la valoración del riesgo relativo de complicación de un AAA a nivel individual. No obstante, hasta el momento, existen datos contradictorios en la utilidad de esta técnica en los AAA, pues sus resultados derivan de estudios basados en series de pacientes cuyas características basales pueden variar significativamente, sobre todo en relación al diámetro medio de los AAA en cada serie. Estudios como el de Sakalihasan ¹⁴⁴ objetivan un incremento en la captación de glucosa celular en sólo 10/26 (39%) de los aneurismas analizados y en una reciente revisión sistemática publicada en 2014 sobre un total de 311 pacientes (AAA=151, controles=159), los autores concluyen que no existe correlación entre la actividad metabólica derivada de la captación de ¹⁸F-FDG y el diámetro aneurismático y que ésta no difiere entre los casos de AAA y los controles ¹⁴⁵.

Los resultados que abogan por un incremento de la actividad metabólica en la pared aneurismática a partir de un incremento en la captación de glucosa celular podrían parecer contrarios a los obtenidos en la presente tesis. Sin embargo, el aumento de captación de glucosa en la pared aórtica aneurismática podría suponer un mecanismo compensatorio de la disminución de la expresión de triosafosfato isomerasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa observada en el grupo AAA de nuestra serie. Del mismo modo, nuestros datos orientan a un predominio del

metabolismo anaerobio, de menor rentabilidad energética, pero no se ha demostrado un aumento o disminución en términos absolutos de la actividad metabólica global en la pared vascular.

En relación a la fuente energética principal celular, la glucosa, en un estudio inmunohistoquímico sobre modelos murinos experimentales, el grupo de Mochizuki¹⁴⁶ determinó un incremento de los transportadores de glucosa (GLUT) en el tejido inflamatorio a partir de la inoculación de *S. aureus* a nivel gemelar de los especímenes. El objetivo del trabajo era la comparación de la captación de glucosa (¹⁴C-FDG) y la modificación de la expresión de los distintos isotipos de GLUT (GLUT 1-GLUT 5) entre un tejido inflamatorio y tumoral. Aunque se objetivó una mayor expresión de GLUT-3 a nivel del tejido inflamatorio sobre el tumoral, estos valores no alcanzaron significación estadística. Partiendo de nuevo del componente inflamatorio en los AAA, estos hallazgos podrían parecer contrarios a los nuestros, en los que se ha objetivado una disminución en la expresión de GLUT-3 en la pared aneurismática respecto al grupo control sin enfermedad asociada. No obstante, en la presente tesis no se ha estudiado la expresión de otros transportadores de glucosa, cuyos niveles se deberán analizar en un futuro para discernir acerca del aporte de dicho sustrato en los AAA. Del mismo modo, no hemos encontrado estudios que comparen la expresión de GLUT en controles no afectados de enfermedad aneurismática tal y como referimos en nuestra serie.

Otro de los puntos relevantes en el metabolismo energético celular es la destinación metabólica del piruvato obtenido en la glucólisis. En situaciones de normoxia, el piruvato es metabolizado a acetil-CoA por el complejo enzimático

piruvato deshidrogenasa, como primer paso antes de su entrada en el ciclo del ácido tricarboxílico para continuar con la oxidación completa de la glucosa. En situaciones en las que el aporte de oxígeno es insuficiente para la oxidación del NADH generado en la glucólisis, el piruvato se reduce a lactato.

En las muestras de tejido aneurismático hemos observado una disminución en los niveles de expresión de piruvato deshidrogenasa y un incremento en el contenido de lactato y piruvato. Este incremento de lactato, sin embargo, no parece deberse a un aumento en la expresión de lactato deshidrogenasa ni modificación en su actividad enzimática en las muestras de AAA, en base a los datos obtenidos en nuestro análisis. Así, el aumento de lactato podría explicarse por una elevación en la concentración del sustrato inicial, piruvato, al disminuir la ruta aeróbica principal, y a una disminución en el aporte de oxígeno a las células de la pared vascular.

En primer lugar, el déficit de piruvato deshidrogenasa, un síndrome genético de herencia ligada al cromosoma X, se ha asociado a acidosis láctica severa, tal y como expone el grupo de Brown¹⁴⁷, con niveles de lactato en sangre >10 mmol/L. En las muestras analizadas con AAA se ha obtenido una disminución de la expresión de este complejo enzimático, tal y como se exponía previamente. En conjunto, los datos sugieren que la reducción de los niveles de piruvato deshidrogenasa en el tejido aneurismático podría dirigir el piruvato hacia la fermentación láctica sin modificar la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa, favoreciendo un estado anaerobio.

En segundo lugar, debemos recordar que el aporte de oxígeno y nutrientes a la pared vascular procede de los *vasa vasorum* y la difusión desde el lumen del vaso a la

misma pared. La hemodinámica vascular normal en el ser humano mantiene un flujo laminar en el interior de los vasos dada la regularidad geométrica de la pared, con un endotelio íntegro. Las alteraciones producidas por la dilatación de la pared en los AAA modifican los parámetros reológicos induciendo un flujo lento y turbulento ¹⁴⁸ que favorece la formación de una capa de trombo para mantener el diámetro del vaso similar al normal. En este sentido, varios trabajos, entre los que destacan los publicados por el grupo de Vorp ^{56, 149-151} han postulado de forma específica la contribución del trombo intraluminal a un estado hipóxico en la pared vascular al disminuir la difusión de oxígeno en aquellas áreas de pared con mayor espesor de trombo. Del mismo modo, a través de un modelo murino experimental y comparación con muestras de tejido aneurismático humano, se ha descrito el desarrollo de aneurismas de aorta infrarrenal al inducir la hipoperfusión de los *vasa vasorum* mediante la ligadura de la aorta infrarrenal ¹⁵². Los efectos de la hipoxia sobre la pared vascular, descritas por Morrison ¹⁵³ sobre modelos experimentales, incluyen alteraciones en la estructura de la capa endotelial junto con cambios metabólicos persistentes consistentes en una reducción de la captación de oxígeno y un incremento hasta del 100% en la ruta del ácido láctico como destino final de la glucosa captada por la pared celular. Posteriormente, determinaciones *in vivo* han demostrado tensiones parietales de oxígeno disminuidas en los AAA ^{56, 151, 154} asociadas a una alteración en la función de las células musculares lisas que conlleva una degradación de la pared vascular, apoptosis celular y potencial formación de un aneurisma aórtico.

El estado hipóxico supone un sello distintivo de los tejidos crónicamente inflamados, junto con acidosis, hipoglucemia e incremento de radicales libres de oxígeno (ROS) ¹⁵⁵. A pesar de que el principal efecto de las bajas concentraciones de

oxígeno sobre la mayor parte de las líneas celulares supone la apoptosis de las mismas, se ha descrito el efecto contrario sobre poblaciones celulares primarias en los que la hipoxia se comporta como un factor estimulante en la supervivencia de los monocitos y macrófagos, tanto en modelos murinos como en líneas celulares humanas¹⁵⁶. Así, la hipoxia parece tener ambos efectos, pro-apoptótico y anti-apoptótico, en relación a la habilidad celular en cada situación particular de adaptarse y promover un metabolismo anaerobio ¹⁵⁷. Desde el punto de vista molecular, cabe destacar uno de los mecanismos centrales de regulación de la homeostasis del oxígeno celular mediante los factores inducidos por hipoxia 1- y 2-alpha (*hypoxia-induced factors* HIF-1 α y HIF-2 α) ¹⁵⁸ que actúan como mediadores principales en la respuesta adaptativa a la hipoxia. En situaciones de baja concentración de oxígeno, estos factores dimerizan y se traslocan al núcleo donde interaccionan con los promotores de genes relacionados con el metabolismo, angiogénesis y apoptosis, entre otros ¹⁵⁵.

En 2009, Muz et al ¹⁵⁹, referían la respuesta mediada por HIF-1 α y HIF-2 α como principal en la patogénesis de la artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por hiperplasia sinovial y destrucción ósea. Ya en los años 70 ¹⁶⁰ se describían concentraciones bajas de oxígeno en el líquido sinovial de los pacientes afectos de artritis reumatoide lo que coincide con los hallazgos en la pared aórtica aneurismática que referíamos previamente. Del mismo modo, se ha descrito la hipoxia como regulador de la expresión de MMP-1 y MMP-3, cuya expresión aumentan los fibroblastos sinoviales de los pacientes con artritis reumatoide, así como una disminución en la expresión de TIMP-1 ¹⁶¹. En relación al metabolismo energético, Yang et al ¹⁶² han descrito recientemente el incremento del metabolismo anaerobio, mediante la obtención de bajas concentraciones de glucosa y

elevado contenido en lactato, y reducción de la oxidación aerobia mediada por HIF como factores claramente contribuyentes a la progresión de la artritis reumatoide, sugiriendo como biomarcadores de dicha entidad las concentraciones de glucosa y ácido láctico en el líquido sinovial de los pacientes afectados de esta enfermedad. Así, el metabolismo energético no solo provee energía para el proceso inflamatorio sino que interviene en la respuesta inmune mediada por vías de señalización metabólica, según dichos autores.

Considerando los AAA como una enfermedad inflamatoria crónica, dados los hallazgos anatomopatológicos referidos, es posible extrapolar los estudios realizados en otras entidades inflamatorias a la patogenia de los mismos. Así, se han descrito ¹⁵⁴, ¹⁶³ niveles elevados de HIF-1 α en los AAA humanos y su implicación en el incremento de la expresión de MMP-2 en los AAA en respuesta a la hipoxia ¹⁶⁴. En relación al metabolismo de la glucosa, los hallazgos obtenidos en nuestra serie concuerdan con los referidos por el grupo de Yang en relación a la artritis reumatoide, con un incremento de las vías anaerobias como fuente principal de energía.

En base a ello, la hipoxia tisular a nivel de la pared vascular se considera uno de los mecanismos patogénicos principales de los AAA en el momento actual, lo que concuerda con los hallazgos aquí obtenidos que orientan a un predominio del metabolismo anaerobio en la patología aneurismática aórtica.

Otro de los factores relevantes en la patogenia de los AAA es el incremento apoptótico de las células musculares lisas de la pared aórtica. Se han descrito diversos mecanismos por los que se ha demostrado mayor destrucción celular en los AAA

respecto a pared aórtica sana. Así, Wang et al ¹⁶⁵, a partir de una respuesta conjunta entre los macrófagos y CML en la pared aórtica, mediada por la hipoxia y el incremento de MCP-1 y la interleukina IL-6, describen la activación de Stat1 como mecanismo apoptótico de las CML contribuyendo a la formación y progresión de los AAA. Otro de los mecanismos responsables de la destrucción celular de las CML en los AAA es el efecto de los radicales libres de oxígeno que inducen un estrés oxidativo mediante la activación de NADPH oxidasa ^{166, 167}. Desde un punto de vista metabólico, siendo tal el objeto de la presente tesis, el mantenimiento de un ambiente reductor, dependiente de un gran aporte energético, se ve disminuido en los AAA. Así, se han descrito mediadores lipídicos como leucotrienos y ácido lisofosfatídico y LDL oxidado como factores promotores de la actividad de NADPH oxidasa ¹⁶⁸. En relación a los resultados obtenidos en nuestro estudio el predominio de las vías anaerobias como principal fuente energética celular, de menor rendimiento energético, junto con el estado hipóxico conocido en los estados inflamatorios crónicos, podría explicar uno de los mecanismos responsables del papel del estrés oxidativo en los AAA.

Por último, otra de las enzimas detectadas en el análisis proteómico diferencial entre el grupo AAA y el grupo control fue la aldehído deshidrogenasa citosólica. Ésta interviene en la oxidación del aldehído en ácidos carboxílicos. Sin embargo, posee una actividad reductasa adicional que cataliza la formación de 1,2-dinitrato de glicerol y nitrito a partir de nitroglicerina ^{169, 170} estando implicada en la vasodilatación mediada por GMPc (guanosin monofosfato cíclico), un compuesto derivado del GTP y que actúa como segundo mensajero en múltiples mecanismos de señalización celular. A pesar de no existir, a nuestro entender, evidencia de la vasorreactividad de

la pared vascular en un AAA en respuesta a vasodilatadores, no podemos descartar la influencia de esta enzima en la distensibilidad reducida de la pared aórtica en los AAA descrita por otros autores ¹⁷¹.

7.1. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El modelo experimental aquí presentado, con grupos con un reducido tamaño muestral, dificultan la valoración de la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos. No obstante, el estudio del metabolismo energético de la pared vascular en presencia de enfermedad aneurismática permite especular acerca de la etiopatogenia de esta entidad, aun en discusión. En este sentido, el grupo de Molacek ¹⁷², contribuye al abandono de la teoría aterosclerótica como origen de la degeneración aneurismática al demostrar un proteoma más rico y variado en los AAA respecto a las aortas ateroscleróticas o sanas. Hasta el momento, sólo este grupo ha descrito de forma específica una modificación en la expresión de una enzima implicada en el metabolismo energético, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, tras el estudio proteómico masivo de muestras de pared aórtica aneurismática frente a controles de donantes en asistolia. El objetivo del trabajo era el estudio del proteoma diferencial entre AAA, enfermedad oclusiva y aortas sanas para la eventual identificación de biomarcadores útiles. Los autores consiguen identificar un total de 25 proteínas, con una disminución significativa ($P < 0,001$) de la expresión de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en los AAA respecto al grupo control sano, lo que concuerda con los hallazgos aquí descritos. A pesar de no esclarecer el papel de esta enzima y las otras identificadas en su trabajo, ni poder determinar biomarcadores, sus hallazgos son sumatorios a los nuestros a la hora de profundizar en los mecanismos implicados en la

modificación metabólica del sitio aneurismático.

Del mismo modo, dada la técnica experimental utilizada, no se puede discernir si la reducción de la expresión de las enzimas relacionadas con el metabolismo objetivada en los AAA deriva de una reducción en la expresión proteica o es el resultado del proceso proteolítico caracterizado en el análisis anatomopatológico de dichos tejidos, al igual que no es posible determinar en qué líneas celulares se produce la modificación de la expresión enzimática. No obstante, cabe destacar que también se han analizado otras proteínas cuyos niveles no se han visto modificados en presencia de enfermedad aneurismática, así como el estudio de la actividad enzimática de algunas de ellas, por lo que, independientemente del mecanismo responsable de la reducción de los niveles proteicos, se pueden considerar estos hallazgos específicos de los AAA. Serán necesarios futuros estudios experimentales para dilucidar la implicación de cada tipo celular específico desde el punto de vista metabólico en la patogenia de los AAA.

Otro de los factores a tener en cuenta en la presente tesis es el análisis del efecto de las estatinas sobre los resultados obtenidos referentes a los AAA. Las estatinas, inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), son fármacos bien establecidos como reductores de los niveles de colesterol, beneficiosos en varias patologías vasculares dados sus efectos pleiotrópicos ¹⁷³. Estudios basados en cultivos *ex vivo* abogan por un efecto antiinflamatorio de las mismas mediante la disminución de la secreción de MMP-9 y proteína quimioattractiva de los monocitos-1 (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein*) en muestras de AAA humanos ¹⁷⁴. Del mismo modo, las estatinas parecen

reducir el crecimiento de los AAA en modelos animales ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ así como en estudios clínicos observacionales en humanos ¹⁷⁸⁻¹⁸¹. No obstante, el efecto terapéutico de las estatinas sobre el crecimiento de los aneurismas sigue siendo controvertido, tal y como exponen Twine y colaboradores ¹⁸² en una revisión sistemática y metaanálisis de doce estudios de cohortes incluyendo un total de 11.933 individuos. De igual forma, el mecanismo de acción de este grupo farmacológico sobre el tejido aneurismático sigue siendo objeto de estudio ¹⁷⁷. Desde un punto de vista metabólico, las estatinas también podrían actuar en los AAA dado que su acción sobre los niveles de colesterol pueden promover cambios en las vías del metabolismo energético. Así, se ha descrito un incremento de la β -oxidación de la cadena larga de los ácidos grasos y la capacidad metabólica del ciclo de Krebs mediada por estatinas al mismo tiempo que parece reducir la glucólisis ¹⁸³. Teniendo en cuenta lo expuesto, se evaluó el efecto de las estatinas entre los pacientes con AAA de nuestra serie, sin encontrar diferencias en la expresión de las enzimas relacionadas con el metabolismo que sí habían mostrado diferencias entre el grupo AAA y el grupo control. Desafortunadamente, el análisis no pudo incluir los pacientes del grupo de donantes dado que carecíamos de dicha información al considerarse bajo protección. No obstante, la ausencia de diferencias entre los pacientes tratados y no tratados con estatinas en el grupo AAA disminuye el posible impacto de estos fármacos en los resultados obtenidos.

Por último, desde el punto de vista analítico, la edad podría comportarse como un factor de confusión entre ambos grupos, dado que el grupo control, con donantes en muerte cerebral, eran significativamente más jóvenes que los pacientes del grupo

AAA. Sin embargo, el efecto de la edad fue descartado en el análisis de regresión lineal al incluir dicha variable como covariante en el modelo.

7.2. TRABAJO FUTURO

Numerosas líneas de investigación buscan dilucidar la etiopatogenia de los aneurismas de aorta abdominal. Así, la comprensión de los mecanismos metabólicos capaces de suplir la energía necesaria para la consecución de todas las reacciones y señalizaciones celulares que conducen al estado patológico y destrucción de la pared vascular parecen esenciales no sólo para explicar la aparición, sino la historia natural de la enfermedad.

En la presente tesis se ha obtenido una primera aproximación al metabolismo energético de los AAA, en el que los datos obtenidos sugieren un estado predominantemente anaerobio con una disminución de la vía respiratoria y acúmulo de piruvato y lactato, junto con una disminución de los transportadores GLUT-3 en el tejido aneurismático.

Por tanto, nuestro grupo se encuentra en una nueva línea de investigación con el objeto de valorar la reproducción de un modelo energético anaeróbico en aorta sana procedente de donantes a partir de una línea de cultivos condicionados. La aproximación metodológica consta de la exposición de aorta sana a medios condicionados por la expresión plaquetaria, células mononucleares y la propia pared aórtica de los pacientes portadores de AAA (Beca de la Mutua Madrileña: “Identificación de proteínas asociadas a la génesis de los aneurismas de aorta

abdominal: papel de las plaquetas y células mononucleadas”). Los hallazgos obtenidos de los nuevos trabajos ayudarán en el adecuado entendimiento del metabolismo energético en los AAA.

8. CONCLUSIONES

- 1.- En el aneurisma de aorta abdominal existe un aumento en la concentración de lactato y piruvato respecto a la pared vascular normal, lo que sugiere la existencia de un metabolismo anaeróbico de la glucosa
- 2.- En el aneurisma de aorta abdominal, con respecto a la aorta sana, hay una reducción en la expresión de piruvato deshidrogenasa, lo que puede suponer una reducción del paso de piruvato a acetil-CoA, apoyando de nuevo el predominio de la vía anaeróbica de degradación del piruvato hacia lactato.
- 3.- En el aneurisma de aorta abdominal, con respecto a la pared vascular sana, existe una reducción en la expresión de dos enzimas claves en el proceso de la glucólisis, la triosafosfato isomerasa y la gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa.
- 4.- La reducción en la expresión de triosafosfato isomerasa y gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa podrían estar relacionadas con la reducción de piruvato deshidrogenasa y, por lo tanto, con la dificultad de continuar el metabolismo aeróbico de la glucosa a través del ciclo de Krebs.
- 5.- En el aneurisma de aorta existe una reducción de la expresión del transportador GLUT-3 de la glucosa en comparación con la aorta sana.
- 6.- Aunque no podemos descartar que otros transportadores de la glucosa estén modificados en el aneurisma de aorta abdominal, la reducción de GLUT-3 podría estar asociado a un intento en la reducción de la glucólisis.

7.- Es probable que la retención del flujo sanguíneo en contacto con la pared aneurismática y, por tanto, la disminución del aporte de oxígeno, favorezca el metabolismo anaeróbico en la pared aórtica aneurismática.

8.- El tratamiento de los pacientes con estatinas no parece modificar los indicios de metabolismo anaeróbico en la pared del aneurisma aórtico.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, et al. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery J Vasc Surg. 1991;13:452-458.
2. Ouriel K, Green RM, Donayre C, et al. An evaluation of new methods of expressing aortic aneurysms size: Relationship to rupture. J Vasc Surg 1992;15:12-18.
3. Wilmink AB, Quick CR. Epidemiology and potential for prevention of abdominal aortic aneurysm. Br J Surg 1998;85:155-162.
4. Bengtsson H, Bergqvist D, Sternby NH. Increasing prevalence of abdominal aortic aneurysms. A necropsy study. Eur J Surg 1992;158:19-23.
5. McFarlane MJ. The epidemiologic necropsy for abdominal aortic aneurysm. JAMA 1991;265:2085-2088.
6. Scott RA, Wilson NM, Ashton HA, et al. Influence of screening on the incidence of ruptured abdominal aortic aneurysm: 5-year results of a randomised controlled study. Br J Surg 1995;82:1066-70.
7. Pleumeekers HJ, Hoes AW, van der Does E, et al. Aneurysms of the abdominal aorta in older adults. The Rotterdam Study. Am J Epidemiol 1995;142:1291-9.
8. Singh K, Bonna KH, Jacobsen BK, et al. Prevalence and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study: the Tromsø Study. Am J Epidemiol 2001;154:236-44.
9. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, et al: The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. Arch Intern Med 2000;160:1425.

10. Webster MW, Ferrell RE, St Jean PL, et al.: Ultrasound screening of first-degree relatives of patients with an abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 1991;13:9-13.
11. Singh K, Bonaa KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S. Prevalence and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study: the Tromsø Study. *Am J Epidemiol* 2001;154:236-44.
12. Graham LM, Zelenock GB, Whitehouse Jr WM, et al. Clinical significance of arteriosclerotic femoral artery aneurysms. *Arch Surg* 1980;115:502-7.
13. Baxter BT, Terrin MC, Dalman RL. Medical management of small abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2008;117:1883-9.
14. Shapira OM, Pasik S, Wassermann JP, et al. Ultrasound screening for abdominal aortic aneurysms in patients with atherosclerotic peripheral vascular disease. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1990;31:170-2.
15. Hallin A, Bergqvist D, Holmberg L. Literature review of surgical management of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 22:197-204.
16. Lindholt JS, Heegaard NH, Vammen S, et al. Smoking, but not lipids, lipoprotein(a) and antibodies against oxidized LDL, is correlated to the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;21:51-6.
17. Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, van Herwaarden JA, Holt PJ, van Keulen JW, Rantner B, Schlösser FJ, Setacci F, Ricco JB; European Society for Vascular Surgery. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011 Jan;41 Suppl 1:S1-S58.
18. Chang JB, Stein TA, Liu JP, et al. Risk factors associated with rapid growth of small abdominal aortic aneurysms. *Surgery* 1997;121:117-22.
19. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, et al. Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. *Aneurysm Detection and Management*

- (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann Intern Med* 1997;126:441-9.
20. Karrowni W, Dughman S, Hajj GP, et al. Statin therapy reduces growth of abdominal aortic aneurysms. *J Investig Med* 2011;59:1239–1243.
 21. Schlosser FJ, Tangelder MJ, Verhagen HJ, et al. Growth predictors and prognosis of small abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2008;47:1127–1133.
 22. Schouten O, van Laanen JH, Boersma E, et al. Statins are associated with a reduced infrarenal abdominal aortic aneurysm growth. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;32:21–26.
 23. Sukhija R, Aronow WS, Sandhu R, et al. Mortality and size of abdominal aortic aneurysm at long-term follow-up of patients not treated surgically and treated with and without statins. *Am J Cardiol* 2006;97:279–280.
 24. Yoshimura K, Nagasawa A, Kudo J, et al. Inhibitory Effect of Statins on Inflammation-Related Pathways in Human Abdominal Aortic Aneurysm Tissue. *Int J Mol Sci* 2015;16:11213-11228.
 25. Ferguson CD, Clancy P, Bourke B, et al. Association of statin prescription with small abdominal aortic aneurysm progression. *Am Heart J* 2010;159:307-13.
 26. Silverberg E, Boring CC, Squires TS. Cancer statistics, 1990. *CA Cancer J Clin* 1990;40:9-26.
 27. Prevention CfDcA: Leading causes of death, United States, 2000-2005. cdc.gov 2008.
 28. Heikkinen M, Salenius JP, Auvinen O. Ruptured abdominal aortic aneurysm in a well-defined geographic area. *J Vasc Surg* 2002;36:291-296.
 29. Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW Jr, et al. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg*. 2003;37:1106-1117.

30. Foster JH, Bolasny BL, Gobbel WG Jr, et al. Comparative study of elective resection and expectant treatment of abdominal aortic aneurysm. *Surg Gynecol Obstet* 1969;129:1-9.
31. Conway KP, Byrne J, Townsend M, et al. Prognosis of patients turned down for conventional abdominal aortic aneurysm repair in the endovascular and sonographic era: Szilagyi revisited? *J Vasc Surg* 2001;33:752-757.
32. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK small aneurysm trial participants. *Ann Surg* 1999;230:289-96.
33. Stenbaek J, Kalin B, Swedenborg J. Growth of thrombus may be a better predictor of rupture than diameter in patients with abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:466-9.
34. Sonesson B, Sandgren T, Lanne T. Abdominal aortic aneurysm wall mechanics and their relation to risk of rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;18:487-93.
35. Hall AJ, Busse EF, McCarville DJ, et al. Aortic wall tension as a predictive factor for abdominal aortic aneurysm rupture: improving the selection of patients for abdominal aortic aneurysm repair. *Ann Vasc Surg* 2000;14:152-7.
36. Lederle FA, Simel DL. The rational clinical examination. Does this patient have abdominal aortic aneurysm? *JAMA* 1999;281:77-82.
37. Lynch RM. Accuracy of abdominal examination in the diagnosis of non-ruptured abdominal aortic aneurysm. *Accid Emerg Nurs* 2004;12:99-107.
38. Lindholt JS, Vammen S, Juul S, et al. The validity of ultrasonographic scanning as screening method for abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;17:472-5.
39. Quill DS, Colgan MP, Sumner DS. Ultrasonic screening for the detection of abdominal aortic aneurysms. *Surg Clin North Am* 1989;69:713-20.

40. Jaakkola P, Hippeläinen M, Farin P, et al. Interobserver variability in measuring the dimensions of the abdominal aorta: comparison of ultrasound and computed tomography. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;12:230-7.
41. Balm R, Eikelboom BC, van Leeuwen MS, et al. Spiral CTangiography of the aorta. *Eur J Vasc Surg* 1994;8:544-51.
42. The UK Small Aneurysm Trial Participants. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. *Lancet* 1998;352:1649-55.
43. Brown PM, Pattenden R, Vernooy C, et al.: Selective management of abdominal aortic aneurysms in a prospective measurement program. *J Vasc Surg* 1996;23:213-220.
44. Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, et al.: Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2002;346:1437-1444.
45. Chaikof EL, Brewster DC, Dalman RL, et al; Society for Vascular Surgery. The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: the Society for Vascular Surgery practice guidelines. *J Vasc Surg* 2009 Oct;50(4Suppl):S2-49.
46. Nowygrod R, Egorova N, Greco G, et al. Trends, complications, and mortality in peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg* 2006;43:205-216.
47. Greenhalgh RM, Brown LC, Kwong GP, et al. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day postoperative mortality results: randomized controlled trial. *Lancet* 2004;364:843-8.
48. Sidawy A, Sumpio B, DePalma R. *The Basic Science of Vascular Disease*. 1997 Futura. Armonk, NY.
49. Aird W. Phenotypic heterogeneity of the endothelium I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007;100:158-173.

50. Levy B, Tedgui A. Biology of the Arterial Wall. 1999 Kluwer Academic Norwell, MA.
51. Kramer R, Bensch K, Davison P, et al.: Basal lamina formation by cultured microvascular endothelial cells. *J Cell Biol.* 99:692-698 1984.
52. Wight T. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* 1989;9:1-20.
53. Sims F. The initiation of intimal thickening in human arteries. *Pathology* 2000;32:171-175.
54. Dobrin PB. Distribution of lamellar deformations: implications for properties of the arterial media. *Hypertension* 1999;33:806-10.
55. Alberding JP, Baldwin AL, Barton JK, et al. Effects of pulsation frequency and endothelial integrity on enhanced arterial transmural filtration produced by pulsatile pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H931–H937.
56. Vorp DA, Lee PC, Wang DH, et al. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *J Vasc Surg* 2001;34:291–299.
57. Kazi M, Thyberg J, Religa P et al. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* 2003;38:1283–1292.
58. Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, et al. For the FAD EU consortium. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovascular Research* 2011;90:18–27.
59. Choke E, Thompson MM, Dawson J, et al. Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2077.
60. Meyer CA, Guivier-Curien C, Moore JE Jr. Trans-thrombus blood pressure

- effects in abdominal aortic aneurysms. *J Biomech Eng* 2010;132:071005.
61. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973;180:1332-1339.
62. Pasterkamp G, Schoneveld AH, van Wolferen W et al. The impact of atherosclerotic arterial remodeling on percentage of luminal stenosis varies widely within the arterial system. A postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3057-63.
63. Labropoulos N, Zarge J, Mansour MA, et al. Compensatory arterial enlargement is a common pathobiologic response in early atherosclerosis. *Am J Surg* 1998;176:140-3.
64. Xu C, Zarins CK, Glagov S. Aneurysmal and occlusive atherosclerosis of the human abdominal aorta. *J Vasc Surg* 2001; 33:91-6.
65. Scherer PW. Flow in axisymmetrical glass model aneurysm. *J Biomech* 1973;6:695-700.
66. Reed D, Reed C, Stemmermann G, et al. Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis? *Circulation* 1992;85:205-11.
67. Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, et al. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study. *Circulation* 2009;119:2202-8.
68. Tilson MD, Stansel HC. Differences in results for aneurysms vs occlusive disease after bifurcation grafts: results of 100 elective grafts. *Arch Surg* 1980;115:1173-5.
69. Cannon DJ, Casteel L, Reed RC. Abdominal aortic aneurysm, Leryche's syndrome, inguinal herniation, and smoking. *Arch Surg* 1984;119:387-9.

70. Lehnert B, Wadouh F. High coincidence of inguinal hernias and abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1992;6:134-7.
71. Antoniou GA, Georgiadis GS, Antoniou SA, et al. Abdominal aortic aneurysm and abdominal wall hernia as manifestations of a connective tissue disorder. *J Vasc Surg* 2011;54:1175-81.
72. Bengtsson H, Bergqvist D, Sternby NH. Increasing prevalence of abdominal aortic aneurysms. A necropsy study. *Eur J Surg* 1992;158:19-23.
73. Fowkes FG, Macintyre CC, Ruckley CV. Increasing incidence of aortic aneurysms in England and Wales. *BMJ* 1989;298:33-5.
74. Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, et al. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol* 1990;137:1199-213.
75. Wolinsky H, Glagov S. Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. Deviation of man from the usual pattern. *Circ Res* 1969;25:667-86.
76. Petrinc D, Liao S, Holmes DR, et al.: Doxycycline inhibition of aneurysmal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kD gelatinase. *J Vasc Surg* 1996;23:336-46.
77. Saratzis A, Abbas AA, Kiskinis D, et al. Abdominal aortic aneurysm: a review of the genetic basis. *Angiology* 2011;62:18-32.
78. Goodall S, Crowther M, Hemingway DM, et al. Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation* 2001;104:304-9.
79. McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, et al. Size matters: the

- relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation* 1997;96:2228-32.
80. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, et al.: Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002;110:625-32.
 81. Williamson RA, Marston FA, Angal S, et al. Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem. J* 1990;268:267-274.
 82. Brew K1, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000(Mar)7;1477:267-83.
 83. Murphy G, Knauper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the 'hemopexin' domain? *Matrix Biol* 1997;15:511-18.
 84. Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res* 1998;8:179-86.
 85. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, et al. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin, *J Biol Chem* 1992;267:4583-91.
 86. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281(5381):1309-12.
 87. McCormick ML, Gavrila D, Weintraub NL. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:461-69.
 88. Newman KM, Jean-Claude J, Li H, et al. Cytokines that activate proteolysis are increased in abdominal aortic aneurysms. *Circulation*

- 1994;90(5Pt2):11224-7.
89. Hamano K, Li TS, Takahashi M, et al. Enhanced tumor necrosis factor- α expression in small sized abdominal aortic aneurysms. *World J Surg* 2003;27:476-80.
90. Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, et al. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 1999;99:96-104.
91. Schönbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P. T(H)2 predominant immune responses prevail in human aortic aneurysm. *Am J Pathol* 2002;161:499-506.
92. Geraghty PJ, Starcher BC, Borhani M, et al. Interleukin-10 deficiency potentiates aortic collagen and elastin degradation in elastase-induced murine aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:676.
93. Moñux G, Serrano FJ, Vigil P, et al. Role of HLA DR in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Europ J Vasc Endovasc Surg* 2003;26:211-214.
94. Ritter JM, Frazer CE, Powell JT, et al. Prostaglandin and thromboxane synthesis by tissue slices from human aortic aneurysms. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1988;32:29–32.
95. Holmes DR, Wester W, Thompson RW, et al. Prostaglandin E2 synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1997;25:810–815.
96. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381–1478.
97. Wang T, Chen Z, Wang X, et al. Cholesterol loading increases the traslocation of ATP synthase beta chain into membrane caveolae in vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:1182-90.

98. Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Bioquímica 3ª Ed. Pearson Educación S.A. 2002.
99. Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, et al. Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 1988;263:15245–248.
100. Asano T, Katagiri H, Takata K, et al. The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem* 1991;266:24632–636.
101. Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 1997;18:533-37.
102. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19:1720-30.
103. Pietrogrande MC, Marchetti N, Dondi F, et al. Decoding 2D-PAGE complex maps: relevance to proteomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006 Mar 20;833:51-62.
104. Maithal K. Proteomics—a new player in the post-genomic era. *Indian J Biochem Biophys* 2002; 39:291-302.
105. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology* 1996;14:61-5.
106. O’Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-21.
107. Bauw G, Van Damme J, Puype M, et al. Protein-electroblotting and microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7701-5.

108. Zamorano-León JJ, Modrego J, Mateos-Cáceres PJ, et al. A proteomic approach to determine changes in proteins involved in the myocardial metabolism in left ventricles of spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem* 2010; 25:347-58.
109. Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, et al. Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients. *J Proteome Res* 2006 Sep; 5:2301-8.
110. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000;405:837-46.
111. Albalat A, Mischak H, Mullen W. Clinical application of urinary proteomics/peptidomics. *Expert Rev Proteomics* 2011;8:615–29.
112. Zhang AH, Sun H, Yan GL, et al. Serum proteomics in biomedical research: a systematic review. *Appl Biochem Biotechnol* 2013;170:774–86.
113. von Zur Muhlen C, Schiffer E, Sackmann C, et al. Urine proteome analysis reflects atherosclerotic disease in an ApoE^{-/-} mousemodel and allows the discovery of new candidate biomarkers in mouse and human atherosclerosis. *Mol Cell Proteomics* 2012;11:M111.013847.
114. Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, et al. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation* 2008;118: 2382–92.
115. Moxon JV, Liu D, Moran CS, et al. Proteomic and genomic analyses suggest the association of Apolipoprotein C1 with abdominal aortic aneurysm. *Proteomics Clin Appl* 2014;8:762–72.
116. Daugherty A, Cassis LA. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2004;24:429–34.

117. Jones KG, Brull DJ, Brown LC, et al. Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2001;103:2260–65.
118. Affril CA, Azim IM, Hanafiah H, et al. MMP-9: biomarker for abdominal aneurysm. *Clin Ter* 2013;164:e479–e483.
119. Molacek J, Mares J, Treska V, et al. Proteomic analysis of the abdominal aortic aneurysm wall. *Surg Today* 2014;44:142–51.
120. Nay Min H, Karlheinz P. Biomarkers for AAA: encouraging steps but clinical relevance still to be delivered. *Proteomics Clin Appl* 2014;8:732–34.
121. López Farré A, González Armengol J, Mateos-Cáceres PJ, et al. Horizontes de la proteómica en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. *Clin Invest Arterioscl* 2008;20:164-72.
122. Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J Proteomics* 2011;74:1829-41.
123. Tuszynski GP, Buck CA, Warren L. A two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) system using sodium dodecyl sulfate-PAGE in the first dimension. *Anal Biochem* 1979;93:329-38.
124. Nakamura K, Okuya Y, Katahira M, et al. Analysis of tubulin isoforms by two-dimensional gel electrophoresis using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in the first dimension. *J Biochem Biophys Methods* 1992;24:195-203.
125. Gordon JA, Jencks WP. The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins. *Biochemistry* 1963;2:47-57.
126. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 1982;6:317-39.

127. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
128. Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López-Farré A, et al. Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1578-83.
129. Chevallet M, Lescuyer P, Diemer H, et al. Alterations of the mitochondrial proteome caused by the absence of mitochondrial DNA: A proteomic view. *Electrophoresis* 2006;27:1574-83.
130. Edman P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem* 1949;22:475.
131. Fenn JB, Mann M, Meng CK, et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64-71.
132. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60:2299-301.
133. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 2001;70:437-73.
134. Modrego J, Maroto L, Tamargo J, et al. Comparative expression of proteins in left and right atrial appendages from patients with mitral valve disease at sinus rhythm and atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010;21:859-68.
135. Misset O, Oppendoes FR. Simultaneous purification of hexokinase, class-I fructose-biphosphate aldolase, triosephosphate isomerase and phosphoglycerate kinase from *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 1984;144:475-83.
136. Farina A, Chambery A, Esposito S, et al. Proteomic profiling of medial

- degeneration in human ascending aorta. *Clin Biochem* 2010;43:387-96.
137. Paul RJ. Smooth muscle energetics. *Annu Rev Physiol* 1989;51:331-49.
 138. Morrison AD, Berwick L, Orci L, et al. Morphology and metabolism of an aortic intima-media preparation in which an intact endothelium is preserved. *J Clin Invest.* 1976 Mar;57:650-60.
 139. Kotze CW, Menezes LJ, Endozo R, et al. Increased metabolic activity in abdominal aortic aneurysm detected by 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) positron emission tomography/computed tomography (PET/CT). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009;38:93-9.
 140. Tawakol A, Migrino RQ, Hoffmann U, et al. Noninvasive in vivo measurement of vascular inflammation with F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Nucl Cardiol* 2005;12:294-301.
 141. Ben-Haim S, Kupzov E, Tamir A, et al. Evaluation of 18F-FDG uptake and arterial wall calcifications using 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med* 2004;45(11):1816-21.
 142. Reeps C, Essler M, Pelisek J, et al. Increased 18F-fluorodeoxyglucose uptake in abdominal aortic aneurysms in positron emission/computed tomography is associated with inflammation, aortic wall instability, and acute symptoms. *J Vasc Surg.* 2008 Aug;48:417-23.
 143. Courtois A, Nusgens BV, Hustinx R, et al. 18F-FDG uptake assessed by PET/CT in abdominal aortic aneurysms is associated with cellular and molecular alterations prefacing wall deterioration and rupture. *J Nucl Med.* 2013 Oct;54:1740-7.
 144. Sakalihasan N, Van Damme H, Gomez P, et al. Positron emission

- tomography (PET) evaluation of abdominal aortic aneurysm (AAA). *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002 May;23:431-6
145. Barwick TD, Lyons OTA, Mikhaeel MG et al. 18F-FDG PET-CT uptake is a feature of both normal diameter and aneurysmal aortic wall and is not related to aneurysm size. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2014) 41:2310–18.
 146. Mochizuki T, Tsukamoto E, Kuge Y, et al. FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models. *J Nucl Med*. 2001 Oct;42:1551-5.
 147. Brown GK, Otero LJ, LeGris M, et al. Pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Med Genet* 1994;31:875-9.
 148. Bogren HG, Mohiaddin RH, Yang GZ, et al. Magnetic resonance velocity vector mapping of blood flow in thoracic aortic aneurysms and grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995 Sep;110:704-14.
 149. Vorp DA, Federspiel WJ, Webster MW. Does laminated intraluminal thrombus within abdominal aortic aneurysm cause anoxia of the aortic wall? *J Vasc Surg* 1996;23:540–41.
 150. Vorp DA, Mandarino WA, Webster MW, et al. Potential influence of intraluminal thrombus on abdominal aortic aneurysm as assessed by a new non-invasive method. *Cardiovasc Surg* 1996;4:732–39.
 151. Vorp DA, Wang DH, Webster MW, et al. Effect of intraluminal thrombus thickness and bulge diameter on the oxygen diffusion in abdominal aortic aneurysm. *J Biomech Eng* 1998;120:579–83.
 152. Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, et al. Hypoperfusion of the Adventitial Vasa Vasorum Develops an Abdominal Aortic Aneurysm. *PLoS One*

- 2015(Aug)26;10(8):e0134386.
153. Morrison AD, Orci L, Berwick L, et al. The effects of anoxia on the morphology and composite metabolism of the intact aortic intima-media preparation. *J Clin Invest.* 1977 Jun;59:1027-37.
 154. Choke E, Cockerill GW, Dawson J, et al. Hypoxia at the site of abdominal aortic aneurysm rupture is not associated with increased lactate. *Ann NY Acad Sci* 2006;1085:306–10.
 155. Tao JH, Barbi J, Pan F. Hypoxia-Inducible Factors in T lymphocyte Differentiation and Function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015;doi:10.1152/ajpcell.00204.2015. Article in press.
 156. Roinitois J, Dinh H, Masendycz P, et al. Hypoxia prolongs monocyte/macrophage Survival and Enhanced Glycolysis is Associated with Their Maturation under Aerobic Conditions. *J Immunol* 2009;182:7974-81.
 157. Walmsley SR, Print C, Farahi N, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF-B activity. *J Exp Med* 2005;201:105-15.
 158. Schönenberger MJ, Kovacs WJ. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Front Cell Dev Biol* 2015;(Jul)21:3:42.
 159. Muz B, Khan MN, Kiriakidis S, et al. Hypoxia. The role of hypoxia and HIF-dependent signalling events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11:201.
 160. Lund-Olesen K: Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum* 1970;13:769-76.
 161. Cha HS, Ahn KS, Jeon CH, et al. Influence of hypoxia on the

- expression of matrix metalloproteinase-1,-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:593-98.
162. Yang XY, Zheng KD, Lin K, et al. Energy Metabolism Disorder as a Contributing Factor of Rheumatoid Arthritis: A Comparative Proteomic and Metabolomic Study. *PLoS One*. 2015 Jul 6;10:e0132695
 163. Sano M, Sasaki T, Hirakawa S, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in abdominal aortic aneurysm. *PLoS One* 2014;9:e89830.
 164. Erdozain OJ, Pegrum S, Winrow VR, et al. Hypoxia in abdominal aortic aneurysm supports a role for HIF-1alpha and Ets-1 as drivers of matrix metalloproteinase upregulation in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Res*. 2011; 48:163–70.
 165. Wang o, Shu c, Su j, et al. A crosstalk triggered by hypoxia and maintained by MCP-1/miR-98/IL-6/p38 regulatory loop between human aortic smooth muscle cells and macrophages leads to aortic smooth muscle cells apoptosis via Stat1 activation. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:2670-79.
 166. Li WG, Miller FJ Jr, Zhang HJ, et al. H₂O₂-induced O₂ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem* 2001;276:29251-56.
 167. Li WG, Stoll LL, Rice JB, et al. Activation of NAD(P)H oxidase by lipid hydroperoxides: mechanism of oxidant-mediated smooth muscle cytotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2003;34:937–46.
 168. Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res*. 2005;65:16 –27.
 169. Beretta M, Gruber K, Kollau A, Russwurm M, Koesling D, Goessler

- W, et al. Bioactivation of nitroglycerin by purified mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenases. *J Biol Chem* 2008;283:17873-80.
170. Beretta M, Wölkart G, Schernthaner M, et al. Vascular bioactivation of nitroglycerin is catalyzed by cytosolic aldehyde dehydrogenase-2. *Circ Res.* 2012 Feb 3;110:385-93.
171. Knipp BS, Peterson DA, Rajagopalan S, et al. Impaired vasoreactivity despite an increase in plasma nitrite in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2002 Feb;35:363-7.
172. Molacek J, Mares J, Treska V et al. Proteomic analysis of the abdominal aortic aneurysm wall. *Surg Today* 2014;44:142–51.
173. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712–19.
174. Wilson WR, Evans J, Bell PR, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) decrease MMP-3 and MMP-9 concentrations in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30:259–62.
175. Shiraya S, Miyake T, Aoki M, et al. Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Atherosclerosis* 2009;202:34–40.
176. Golledge J, Cullen B, Moran C, et al. Efficacy of simvastatin in reducing aortic dilatation in mouse models of abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010;24:373–78.
177. Yoshimura K, Nagasawa A, Kudo J, et al. Inhibitory effect of statins on inflammation-related pathways in human abdominal aortic aneurysm tissue. *Int J Mol Sci.* 2015 May 18;16:11213-28.

178. Karrowni W, Dughman S, Hajj GP, et al. Statin therapy reduces growth of abdominal aortic aneurysms. *J Investig Med* 2011;59:1239–43.
179. Schlosser FJ, Tangelder MJ, Verhagen HJ, et al. Growth predictors and prognosis of small abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2008;47:1127–33.
180. Schouten O, van Laanen JH, Boersma E, et al. Statins are associated with a reduced infrarenal abdominal aortic aneurysm growth. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;32:21–26.
181. Sukhija R, Aronow WS, Sandhu R, et al. Mortality and size of abdominal aortic aneurysm at long-term follow-up of patients not treated surgically and treated with and without statins. *Am J Cardiol* 2006;97:279–80.
182. Twine CP, Williams IM. Systematic review and meta-analysis of the effects of statin therapy on abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg*. 2011 Mar;98:346-53.
183. Wang W, Wong CW. Statins enhance peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha activity to regulate energy metabolism. *J Mol Med (Berl)*. 2010 Mar;88:309-17.